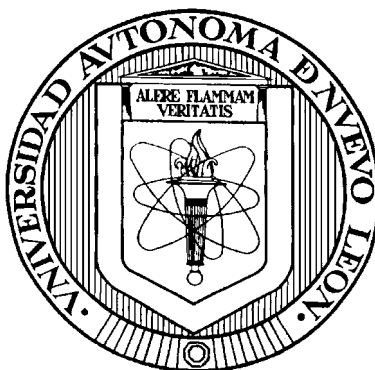


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS
RESISTENTES A METALES PESADOS**

Por

Q.F.B. MIREYA ZAVALA HERNÁNDEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRA EN CIENCIAS con Especialidad en
Microbiología Industrial**

Enero, 2 0 0 7

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS
AUTÓCTONOS RESISTENTES A METALES PESADOS**

ACEPTADOS

Aprobación de la Tesis:

Asesor de la Tesis

Jefe de la División de Estudios de Postgrado o
Secretario de Postgrado o
Subdirector de Estudios de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. María Teresa Garza González Director de mi tesis. Así como a la Dra. Martha A. Suárez y a Dr. Sergio Fernández Delgadillo por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión del presente trabajo.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por permitirme el uso de las instalaciones y equipo del Laboratorio de Biotecnología del Centro de Laboratorios Especializados y por su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

A la Secretaría de Educación Pública por el apoyo económico prestado a través del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) en el proyecto CN 728-02.

Al Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey por el apoyo económico para la realización de mis estudios. Además de permitirme realizar parte de la investigación en las Instalaciones del Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Biotecnología.

También deseo agradecer al Dr. Sergio Serna Saldívar excelente investigador, al Dr. Mario Moisés Álvarez, director del Centro de Biotecnología y al Dr. Manuel Zertuche del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, por su apoyo invaluable durante los años que elaborado en el Instituto.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi esposo Ramiro Ramírez Gracia por su amor , apoyo y comprensión durante todo este tiempo que hemos compartido juntos (Ramiro, te amo), a mis hijos Ramiro, Joel y Mireya Araxi por haberme dado la dicha de ser madre y por su cariño incondicional que siempre he recibido “Son el aire que respiro”, a mis padres Ma. Elena Hernández y Arturo Zavala “ En esta roca edificaré mi templo” y hermanos por su apoyo moral y confianza “Hermanos hasta la otra vida”, a mis amigas Nohemí, Yadira y Andrea (chicas las quiero) y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

Y en especial a mi asesora Dra. Ma. Teresa Garza González por ser una extraordinaria persona, amiga, compañera y guía, me demostró que con perseverancia todo se logra.

¡A todos Gracias!

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1. Hipótesis.....
- 1.2. Objetivo.....
- 1.3. Tareas a desarrollar.....
- 1.4. Aspectos novedosos.....
- 1.5. Aportes teóricos y prácticos de estos resultados.....

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

- 2.1. Metales pesados y su impacto ambiental.....
 - 2.1.1. La situación de México.....
- 2.2. Interacción de los microorganismos con los metales tóxicos.....
- 2.3. Microorganismos autóctonos y resistencia.....
- 2.4. El uso de microorganismos resistentes o tolerantes a metales pesados.....

3. MATERIALES Y MÉTODOS

- 3.1. Origen de las muestras.....
- 3.2. Aislamiento de microorganismos tolerantes a metales pesados.....
- 3.3. Determinación de la resistencia a la presencia de los metales Pb(II), Cr(VI), Cd(II), Cu(II), Zn(II), Ni(II).....
 - 3.3.1. Preparación del inóculo
 - 3.3.1.1. Bacterias.....
 - 3.3.1.2. Técnica de dilución y siembra en placa.....
 - 3.3.1.3. Hongos.....
 - 3.3.1.4. Conteo de esporas.....
- 3.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de plomo(II), cobre(II), cadmio(II), zinc(II), níquel (II) y cromo (VI).....
- 3.5. Identificación de microorganismos resistentes a metales pesados
 - 3.5.1. Bacterias.....
 - 3.5.2. Criterios morfológicos usados para la identificación de bacterias.....
 - 3.5.3. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias
 - 3.5.3.1.1. Método tradicional.....
 - 3.5.3.1.2. Métodos rápidos
 - 3.5.3.1.2.1. Sistema BBL CRYSTAL.....
 - 3.5.3.1.2.2. Sistema API 20.....
 - 3.5.4. Hongos
 - 3.5.4.1. Levaduras.....
 - 3.5.4.2. Hongos filamentosos.....
 - 3.5.5. Identificación Microscópica
 - 3.5.5.1. Preparación en fresco.....
 - 3.5.5.2. Preparación de micocultivo.....
 - 3.5.6. Criterios para la identificación de hongos filamentosos.....
 - 3.5.7. Pruebas preliminares para la remoción de los metales plomo(II), cobre(II), cadmio(II), zinc(II), níquel (II) y cromo (VI).....

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- 4.1. Aislamiento de los microorganismos autóctonos resistentes a metales pesados.....
- 4.2. Determinación de los niveles de resistencia a plomo (II), cromo (VI), cadmio (II), cobre (II), zinc (II) y níquel (II).....
- 4.3. Identificación de los aislados con resistencia multimetálica.....

4.3.1.	Bacterias	
4.3.1.1.	Identificación de bacterias.....	
4.3.2.	Hongos filamentosos	
4.3.2.1.	Identificación de hongos.....	
4.3.3.	Levaduras	
4.3.3.1.	Identificación de levaduras.....	
4.4.	Pruebas preliminares de bioadsorción de metales de la biomasa de los microorganismos que presentaron mayor resistencia multimetálica.....	
5.	CONCLUSIONES.....	
6.	RECOMENDACIONES.....	
7.	APENDICES.....	
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
I. Concentración mínima inhibitoria de metales pesados sobre el crecimiento de diferentes microorganismos.....	21
II. Medio de Cultivos para el aislamiento y purificación de Bacterias y Hongos.....	31
III. Medio Luria Bertani.....	35
IV. Condiciones generales para las pruebas de resistencia.....	35
V. Composición del medio de cultivo para la producción de biomasa de hongos.....	44
VI. Composición del medio de cultivo para la producción de biomasa de bacteria.....	44
VII. Relación del número total de aislados capaces de crecer en presencia de 50 mg.L ⁻¹ de plomo (II), cromo (VI), cadmio (II), cobre (II), zinc (II) y níquel (II) y fuentes de aislamiento.....	48
VIII. Relación de aislados de bacterias (B), Hongos filamentosos (HF) y levaduras (L) obtenidos en medios de cultivo suplementados con 50 mg L ⁻¹ de cada metal.....	49
IX. Crecimiento de bacterias en medios con plomo(II), cromo (VI), cadmio (II), cobre (II), zinc (II) y níquel (II)	52
X. Crecimiento de hongos filamentosos en medios con plomo(II), cromo (VI), cadmio (II), cobre (II), zinc (II) y níquel (II)	55
XI. Crecimiento de levaduras en medios con plomo (II), cromo (VI), cadmio (II), cobre (II), zinc (II) y níquel (II).....	59
XII. Resumen de las características morfoculturales, perfil bioquímico y ubicación taxonómica de los aislados bacterianos resistentes a plomo(II), cromo (VI), cadmio (II), cobre (II), zinc (II) y Níquel.....	61
XIII. Resultados de las pruebas para la identificación de los aislados bacterianos resistentes a plomo(II), cromo (VI), cadmio (II), cobre (II), zinc (II) y níquel (II), utilizando el método API 20E.....	68
XIV. Resultados de las pruebas para la identificación de los aislados bacterianos resistentes a plomo (II), cromo (VI), cadmio (II), cobre (II), zinc (II) y Níquel (II), utilizando el método BBL CRISTAL.....	69
XV. Resumen de las principales características morfoculturales, y ubicación taxonómica de los aislados fúngicos resistentes a plomo (II), cromo (VI), cadmio (II), cobre (II), zinc (II) y Níquel (II).....	76
XVI. Características morfoculturales y ubicación taxonómica de los aislados de levaduras resistentes a plomo(II), cromo (VI), cadmio (II), cobre (II), zinc (II) y Níquel (II).....	87

XVII. Concentración mínima inhibitoria de plomo(II),cromo (VI), cadmio(II), cobre(II), zinc(II) y níquel(II) del crecimiento de bacterias y hongos y sus fuentes de aislamiento.....	90
XVIII. Bioadsorción de Pb(II), Cr (VI), Cd (II), Cu(II), Zn(II) y Ni(II) utilizando diferentes biomasas microbianas a temperatura de 25 0C, en disoluciones de 60 mgL ⁻¹ . 16h de contacto. (n=3).....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Mecanismos de interacción entre microorganismos y metales pesados.....	19
2. Cámara de conteo celular.....	34
3. Esquema de Identificación de levaduras.....	40
4. Distribución porcentual de los grupos microbianos aislados en presencia de 50 mg.L ⁻¹ de plomo (II), cromo (VI), cadmio (II), cobre (II), zinc (II) y níquel (II).....	47
5. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Bacillus cereus</i>	64
6. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Pseudomonas</i>	64
7. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Bacillus brevis</i>	64
8. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Staphylococcus simulans</i>	65
9. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Acinetobacter anitratus</i>	65
10. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Corynebacterium jeikeium</i>	65
11. Superficie y reverso de <i>Acremonium falciforme</i>	79
12. Características microscópicas de <i>Acremonium falciforme</i>	79
13. Superficie y reverso de <i>Alternaria alternata</i>	79
14. Características microscópicas de <i>Alternaria alternata</i>	79
15. Superficie y reverso de <i>Aspergillus niger</i>	80
16. Características microscópicas de <i>Aspergillus niger</i>	80
17. Superficie y reverso de <i>Fusarium oxysporium</i>	80
18. Características microscópicas de <i>Fusarium oxysporium</i>	80
19. Superficie y reverso de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	81
20. Características microscópicas de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	81
21. Superficie y reverso de <i>Trchoderma viride</i>	82
22. Características microscópicas de <i>Trichoderma viride</i>	82
23. Superficie y reverso de <i>Penicillium chrysogenum</i>	82
24. Características microscópicas de <i>Penicillium chrysogenum</i> .	82
25. Superficie y reverso de <i>Rhizopus arrizus</i>	83
26. Características microscópicas de <i>Rizopus arrizus</i>	83
27. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Rhodotorula rubra</i>	88
28. Características macroscópicas y microscópicas de <i>S. cerevisiae</i>	88

NOMENCLATURA

AI	Agua Industrial
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Fig.	Figura
g	Gramo
LA	Lodo Activado
μm	Micras
$5\ \mu\text{g L}^{-1}$	Microgramo por litro
mg L^{-1}	Miligramo por litro
mL	Mililitro
%	Porcentaje
pH	Potencial de hidrógeno
r.min^{-1}	Revoluciones por minuto
SRP	Rio Pesquería
SRSJ	Rio San Juan
SRSC	Rio Santa Catarina
T	Tierra
UFC	Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

Mireya Zavala Hernández

Fecha de Graduación: Febrero, 2007

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

**Título del Estudio: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE
MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS
RESISTENTES A METALES PESADOS**

Número de páginas:

**Candidato para el grado de Maestría
en Ciencias con Especialidad en
Microbiología Industrial**

Área de Estudio: Biotecnología

Propósito y Método del Estudio: Este trabajo se centró en la obtención de microorganismos resistentes a metales pesados a fin de obtener cepas nativas que puedan ser estudiadas para fines académicos o de investigación.

Se seleccionaron muestras de diferentes ecosistemas contaminados con metales pesados. Para el aislamiento de los microorganismos se aplicó el cultivo de enriquecimiento utilizando medios de cultivo suplementados con plomo (II), cadmio (II), cobre (II), níquel (II), zinc (II) y cromo (VI).

La resistencia a los seis metales en estudio fue realizada para cada uno de los aislados aplicando los métodos de dilución en tubo. Se determinó Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y los aislados que presentaron valores altos de CMI de los seis metales estudiados fueron identificados con base a sus características morfológicas, pruebas bioquímicas y fisiológicas..

Contribuciones y Conclusiones:

Se aislaron 53 microorganismos de los cuales 34 cepas fueron hongos filamentosos, 17 cepas bacterias y dos levaduras. Todos ellos crecieron en concentraciones de 50 mgL⁻¹ de cada metal. Se identificaron diez cepas bacterianas y doce cepas fúngicas (11 hongos filamentosos y una levadura) con resistencia sobresaliente a los seis metales en estudio. Los mayores valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) oscilaron entre: 200- 3700 mg.L⁻¹ de cada metal. Los valores CMI de plomo(II) y zinc(II) superan hasta tres veces a los informados en la literatura consultada. Los géneros *Acremonium* y *Paecilomyces* no han sido reportados en la literatura como multirresistentes a metales.

Se estima que los microorganismos obtenidos, debido a su alta resistencia multimetálica son candidatos a ser estudiados para la producción de biosorbentes de metales pesados, biosensores o como nanofábricas de CdS y ZnS especialmente los hongos filamentosos.

FIRMA DEL ASESOR:_____

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental por metales tóxicos es ocasionada a través de actividades militares, industriales y agrícolas. La industria de combustibles genera 2.4 millones de toneladas anuales de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, y V. La industria metal mecánica y minera contribuye con 0.39 millones de toneladas por año, mientras que las prácticas agrícolas contribuyen con 1.4 millones, la industria de manufactura con 0.24 millones y otros residuos con 0.72 millones de toneladas por año. Los metales son descargados al medio ambiente ocasionando un gran impacto ecológico, económico y en salud. (Gadd, 1993).

Un problema importante que se ha presentado desde hace algunos años es el aumento de los desechos tóxicos de la industria hacia los ríos y lagos de nuestra región. Algunos de los principales contaminantes son los metales pesados y radionúclidos que afectan la salud humana y a los ecosistemas naturales de estos lugares.

Los metales más peligrosos para la salud son: plomo, mercurio, berilio, bario, manganeso, níquel, estaño, vanadio, cadmio, arsénico, cobre, zinc,

cromo. Estos metales se encuentran naturalmente en el suelo en cantidades mínimas, alguno de los cuales son esenciales para los procesos biológicos. Pero cuando están concentrados en ciertas áreas, constituyen un serio peligro ecológico y para la salud del hombre (Volezky 1996). El arsénico, zinc y el cadmio, pueden causar cáncer. El mercurio y cromo provocan mutaciones y daños genéticos, mientras que el cobre, el plomo y el mercurio ocasionan lesiones cerebrales y óseas (Valdés, 1999; Montoya, 1996).

Existen evidencias de envenenamiento por metales pesados en la población infantil de Torreón, Coahuila, en el Norte-Centro de México en donde se incluye a Monterrey y su área metropolitana (Valdés, 1999).

Por otro lado se mencionan gran cantidad de casos de daños causados por metales pesados a los ecosistemas naturales de ríos y lagos, afectando a la fauna y flora microbiana y cambiando de manera radical su ambiente natural. Tal es el caso del Río Bravo contaminado con arsénico, mercurio, plomo y en Mazatlán, Sinaloa Baja California, Golfo de México y Veracruz por cadmio. En este último según el organismo "Green-peace", se han afectado a más de 12 municipios veracruzanos y amenaza los recursos naturales del río, entre los que se cuentan 46 especies distintas de peces y una amplia variedad de vegetación (González, 2000).

La presencia de metales pesados en el medio ambiente y el incremento de su concentración ejerce una fuerte presión de selección sobre los organismos que allí habitan (Cervantes y Vaca, 1990; Silver, S., T.K. Misra. 1988) un incremento en su concentración puede ejercer una presión selectiva capaz de modificar la flora microbiana (Montuelle et al., 1994). Si la descarga del contaminante es de carácter permanente, como sucede habitualmente con los metales pesados, se produce una selección de aquellos genotipos que pueden sobrellevar dicho estrés (Silver y Walderharg, 1992).

La relación contaminante-microorganismo origina una serie de procesos adaptativos que finalmente se expresan como mecanismos de resistencia hacia el contaminante (Montuelle et al., 1994; Anisimova et al., 1993). Diversos estudios para determinar el efecto sobre la flora bacteriana se han realizado en ecosistemas impactados por estos contaminantes, observándose que la resistencia bacteriana a metales suele estar asociada con la resistencia a antibióticos, como es el caso de la resistencia al mercurio.

Los microorganismos indígenas cuentan con distintos mecanismos de resistencia o tolerancia desarrollados en ambientes contaminados con metales pesados. Un mecanismo común es la codificación de un plásmido que le da la propiedad al microorganismos para expulsar los metales hacia el exterior. Alternativamente, los metales pesados pueden ser secuestrados por adsorción en la pared celular o detoxificación por la unión a ligandos, proteínas o

polímeros. Además presentan mecanismos enzimáticos que les permiten iones metales a compuestos organometálicos. (Clifford, 1997).

La capacidad de los microorganismos para capturar metales ha sido aprovechada para su utilización como biosorbentes de dicho metales, lo que ofrece una alternativa para la destoxificación de medios contaminados y para la recuperación de metales pesados o valiosos, presentes en lodos y aguas residuales de la industria (Nies, 1999). La remoción y recuperación de metales pesados se basa en las propiedades de secuestación del metal con ciertos materiales naturales o de origen biológico. Algunos tipos de biomasa microbiana pueden retener relativamente altas cantidades de iones metálicos por sorción “pasiva” y/o complejación. Comúnmente se conoce como biosorción. Este mecanismo se ha considerado como una alternativa económica y ecológica para eliminar metales pesados de medios acuosos contaminados.

Debido a lo anterior, se destaca la importancia del estudio de ecosistemas contaminados a fin de encontrar microorganismos adaptados de manera natural a contaminantes altamente tóxicos como son los metales pesados, cultivarlos en el laboratorio, estudiar su capacidad para resistir o tolerar altas concentraciones de metales pesados y buscar el aprovechamiento de esta característica para utilizarlos en diferentes procesos especialmente los de biorremediación.

1.1 HIPÓTESIS

Es posible que en las zonas donde se concentran metales pesados se formen ecosistemas que contengan microorganismos altamente resistentes a éstos, algunos de los cuales pueden ser aislados y caracterizados por las técnicas rápidas y tradicionales.

1.2 Objetivo

Aislar y caracterizar bacterias, levaduras y hongos filamentosos resistentes a los metales plomo(II), cadmio(II), cobre(II), níquel(II), zinc(II) y cromo(VI), a partir de ecosistemas contaminados, a fin de seleccionar los microorganismos que puedan ser estudiados como una posible alternativa para la producción de bioadsorbentes de metales pesados.

Para lograr este objetivo se plantearon las siguientes tareas

1.3 Tareas a desarrollar.

1. Seleccionar las fuentes de aislamiento y colección de muestra.
2. Aislar y purificar hongos filamentosos, levaduras y bacterias de diferentes fuentes.
3. Realizar pruebas de resistencia o tolerancia a diferentes concentraciones de metales pesados como Cr(VI), Cu(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II) y Pb(II) de los microorganismos purificados e identificados.

4. Identificar los aislados: hongos filamentosos, levaduras y bacterias, que presentaron mayor resistencia a los 6 metales en estudio.
5. Seleccionar los microorganismos más resistentes y realizar pruebas preliminares de biosorción de Cr(VI), Cu(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II) y Pb(II)

1.4 Este trabajo presenta los siguientes aspectos novedosos.

- ♣ La investigación de ecosistemas no estudiados.
- ♣ El encontrar microorganismos autóctonos con características potenciales de resistencia o tolerancia a metales pesados (seis metales).
- ♣ Se instituye noción acerca de nuevas especies que pudieran ser utilizadas como biosorbentes de metales pesados.
- ♣ Se promueve el estudio acerca de la resistencia a metales pesados de las bacterias, hongos filamentosos y levaduras.

1.5 Aportes teóricos y prácticos de estos resultados.

El conocimiento derivado de esta investigación científica servirá como apoyo a nuevas investigaciones especialmente las relacionadas con el estudio de los mecanismos de resistencia de los microorganismos obtenidos y la búsqueda de aplicaciones industriales de estos microorganismos, tales como biorremediación, biolixiviación, producción de biosensores y biosíntesis de nanopartículas.

Uno de los aportes que se pretende difundir con esta investigación es la de transmitir a todo ser humano la importancia de los microorganismos como fuente potencial para la recuperación y destoxificación de ambientes naturales, así como la remediación de aguas y suelos contaminados.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Metales pesados y su impacto ambiental.

Los avances en la ciencia y la tecnología desde la revolución industrial, han aumentado la capacidad del ser humano para explorar los recursos naturales. Debido a lo anterior, se han generado serias perturbaciones en los ciclos biogeoquímicos elementales.

La contaminación del ambiente con metales tóxicos y radionúclidos surge como resultado de actividades humanas, principalmente industriales, sin embargo, fuentes como la agricultura y la eliminación de residuos también contribuyen. Estos contaminantes son descargados en la atmósfera y en los ambientes acuáticos y terrestres, principalmente como solutos o partículas y pueden alcanzar concentraciones elevadas, especialmente cerca del sitio de descarga. (Cañizares, 2000).

El estudio de los metales es de gran importancia en términos de contaminación ambiental debido a sus efectos tóxicos sobre los organismos vivos. Específicamente, las bacterias han sido objeto de numerosos estudios

por su participación en los ciclos biogeoquímicos de los elementos esenciales para la vida (C, N, P y S), así como por su capacidad para transformar compuestos no esenciales, que eventualmente pueden representar una amenaza para el ambiente.

Los metales pesados actúan dentro del organismo reaccionando con los aminoácidos que contiene azufre en las enzimas como la cisteína y también atacan a los grupos ácido y amino de los aminoácidos de las proteínas, provocando trastornos multifuncionales.

Entre los metales más utilizados por la industria se encuentran el plomo, cadmio, cobre, cromo, zinc y níquel.

El plomo es un tóxico sistémico que afecta al sistema hematopoyético, nervioso y renal. En la sangre el plomo impide la unión del ión ferroso con la protoporfirina para dar la hemoglobina, como consecuencia se excreta por la orina el ácido delta amino levulínico que sirve para detectar la intoxicación. Además afecta al sistema nervioso, al hígado y al riñón. Se recomienda no exceder en el agua de 15 y de 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ en el aire durante 8 horas al día.

El cadmio es hepatotóxico y nefrotóxico, a bajas concentraciones irrita el estómago, causando vómito y diarrea. Se recomienda un límite de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ en el

agua potable y 15 mg L^{-1} en alimentos y no pasar de $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ en el aire por 8 horas de exposición.

La acumulación de cobre causa daño progresivo en el hígado cuya expresión más severa es la cirrosis hepática. El depósito de cobre en el sistema nervioso central produce un daño neurológico, que en algunos aspectos se parece a la enfermedad de Parkinson.

El cromo VI causa reacciones alérgicas fuertes incluso en pequeñas concentraciones. La bronquitis asmática es otra reacción alérgica conectada con el cromo VI. Puede también afectar el DNA, producir úlceras, convulsiones e incluso la muerte según el grado de exposición así mismo aumenta el riesgo de producir cáncer de pulmón. En el agua potable su límite es $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ y en aire $52 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. La MRL por inhalación intermedia es de $0,001 \text{ mg L}^{-1}$.

El zinc es un elemento esencial en la dieta humana, el déficit es perjudicial y también lo es a altas dosis. En animales la ingestión elevada durante mucho tiempo daña el páncreas, produce anemia, y disminuye el colesterol de alta densidad. Por inhalación de humo con zinc hay daño en los pulmones y afecta a la temperatura corporal. En el agua potable se recomienda 5 mg L^{-1} . El MRL vía oral crónica es de $0,3 \text{ mg/kg/día}$.

El níquel produce, en algunas personas sensibles a él, alergias asmáticas, bronquitis y cáncer de pulmón y nasal a trabajadores expuestos durante muchos años. Por ingestión de elevadas dosis en aguas potables contaminadas produce efectos en sangre y riñones. Para niños, en el agua potable no debe superar los $0,04 \text{ mgL}^{-1}$ hasta 10 días de exposición. El MRL por inhalación crónica es de $0,0002 \text{ mgL}^{-1}$.

2.1.1 La Situación en México

En México, al igual que en el resto del mundo, el número de emergencias ambientales cada vez es mayor debido al incremento en la comercialización y usos de productos químicos.

Nuestro país ha sido escenario de graves emergencias como la ocurrida en el Pozo Ixtoc en junio de 1979, en la Sonda de Campeche, la explosión de esferas de Gas L.P en San Juan Ixhuatepec, Edo. de México en 1984, el incendio de agroquímicos en la empresa Anaversa en Córdoba, Veracruz en 1991 y la explosión en el sistema de alcantarillado del Sector Reforma, en la Ciudad de Guadalajara, Jalisco, en abril de 1992, por citar algunos de los que más han impactado tanto a la población como al ambiente. En este sentido, de acuerdo con las estadísticas de la Procuraduría Federal de Protección Ambiente, cada año se presentan en México un promedio de 550 emergencias ambientales asociadas con materiales peligrosos. (PROFEPA).

Los metales pesados se han convertido en un tema actual en el campo ambiental como en la salud pública debido a que los metales pesados disueltos que se encuentran en el medio ambiente representan un grave peligro para la salud humana debido a que éstos se acumulan en tejidos vivos a través de la cadena alimenticia.

Recientemente ha llamado la atención de la prensa internacional y nacional, el caso del envenenamiento por metales pesados en la población infantil de Torreón, Coahuila, en el Norte-Centro de México.

El problema en la ciudad de Torreón es provocado por el plomo, el cadmio y el arsénico, tres elementos altamente dañinos para los humanos. El envenenamiento por metales pesados se debe al funcionamiento de la cuarta fundidora más importante del mundo, propiedad de la compañía Peñoles, situada en el centro de la ciudad de Torreón. Otro caso reciente de contaminación con plomo es el que afecta a los vecinos de la empresa Pigmentos y Óxidos, S. A en el área metropolitana de Monterrey, N. L. (Valdez-Perezgarza F., 2001).

En México las maquiladoras de Galvanoplastia (cromado de piezas) son fuente de contaminación del agua con cromo (II) y cromo (VI) metales altamente tóxicos.

Durante décadas, el plomo se ha utilizado en pinturas, gasolinas, soldaduras, plomería, enseres domésticos. Los niños son especialmente susceptibles a los efectos tóxicos del plomo. (Valdez-Perezgarza F., 2001).

La moderna producción industrial y agrícola conduce a numerosas posibilidades de contaminación con sustancias nocivas. Los lixiviados, pesticidas, fertilizantes y metales pesados, entre otros, son sumamente tóxicos y contaminan el suelo, agua y aire. Uno de los problemas más importantes es la eliminación adecuada de los desechos sólidos municipales e industriales. Las principales fuentes de residuos industriales provienen de compañías mineras, manufactureras y petroleras. La mayoría de las instalaciones manufactureras están ubicadas en la frontera y en las zonas norte y centro del país. Diferentes publicaciones han evidenciado que estas maquiladoras vierten importantes cantidades de sustancias altamente tóxicas, entre otras, los metales pesados arsénico, mercurio plomo y cadmio en el Río Bravo lo que ha provocado mortandad de peces y tienen efectos nocivos en la salud del ser humano. Las aguas de este río son utilizadas para actividades de pesca y riego agrícola. Grupos ambientalistas del país afirman que muchas de las empresas extranjeras se establecen en México no solamente por la mano de obra barata, sino también porque aquí la ley de protección ambiental no es tan estricta. En otro estudio realizado en el área metropolitana se demostró que los bebés de mujeres con valores altos de plomo en sangre pesaron menos que los hijos de las madres con concentraciones bajas. Pero los problemas de contaminación no solo se localizan en esta gran metrópoli.

En otras zonas del país la contaminación por metales pesados ha afectado los recursos marinos. En Mazatlán, Sinaloa el incremento de estas sustancias en aguas costeras tuvo un efecto negativo en la eclosión de huevos, sobrevivencia de nuplios y larvas de camarón. El cultivo de ostiones, importante recurso de México, es afectado por la creciente contaminación por metales en lugares como Baja California, Golfo de México y Veracruz (Botello *et al*, 1998). De acuerdo a con estudios de las organizaciones ambientalistas, en las zonas relacionadas con vertederos de desechos de Petróleos Mexicanos los recursos acuíferos de Coatzacoalcos, Veracruz presentan altos niveles de metales pesados. Existen evidencias científicas que asocian estos compuestos con graves daños a la salud. El impacto ecológico causado por los cinco complejos petroquímicos de la región, según Green-peace, ha afectado a más de 12 municipios veracruzanos y amenaza los recursos naturales del río, entre los que se cuentan 46 especies distintas de peces y una amplia variedad de vegetación.

2.2 Interacción de los microorganismos con los metales tóxicos

Los metales pesados se acumulan en cuerpos de agua, particularmente en sedimentos y cuando se incrementan sus concentraciones bloquean los procesos metabólicos de los organismos vivos. Sin embargo, existen interacciones entre los microorganismos y los metales para responder a los efectos tóxicos de éstos (Gaylarde y Videla, 1995), para lo que han desarrollado diferentes mecanismos que le permiten la captación y destoxificación de los metales pesados; en estos mecanismos participan

diferentes partes de la célula y sus localizaciones varían entre organismos de diferentes niveles celulares (procarióticos y eucarióticos), entre especies y grupos de cepas (Gadd y White, 1993).

-En la membrana celular y espacio periplásmico: Adsorción, intercambio iónico, reacciones redox, precipitación, difusión y transporte (captación y expulsión). (Vargas *et al*, 1998; Gázsó, 2001).

-En la pared celular: Adsorción, intercambio iónico, unión covalente, reacciones redox y precipitación. (Lovley, 2000; Amoroso *et al*, 2001).

-Materiales asociados a la célula como polisacáridos, mucílago, cápsulas y cubiertas mucosas: atrapamiento de partículas, enlazamiento no específico y precipitación. (Volesky y Holan, 1995; Wase y Forster, 1997; Cañizales, 2000).

-Reacciones intracelulares: metalotioninas, péptidos de metal gamma-glutamil cisteína, enlazamiento no específico, quelatación y reacciones redox. (Lovley y Coates, 1997; Brown *et al*, 1994; Chen y Wilson, 1997; Sato y Kondoh, 2002).

-Reacciones extracelulares: precipitación por productos excretados como oxalato o sulfuro, formación de complejos y quelación, sideróforos. (Birch y Bachoferon, 1990; McEldowney, 2000).

2.3 Microorganismos autóctonos y resistencia

Los microorganismos han sido expuestos a los metales de los orígenes del planeta, en las zonas volcánicas y chimeneas negras y de esta manera fueron adaptándose y desarrollando mecanismos de supervivencia. Las actividades humanas y los procesos industriales han contribuido en gran proporción al aumento de la contaminación de medios naturales. La contaminación de los

ríos, arroyos, y otros mantos acuíferos con metales pesados ha provocado la adaptación de su microbiota. Ésta ha adquirido potencialidad de resistencia a estos contaminantes a causa de sus características genéticas (Ochiai, 1987). Debido a esto, existe en la actualidad una variedad de ecosistemas ricos en metales que son fuente de aislamiento de una gran diversidad microbiana con capacidad para resistir elevadas concentraciones de metales pesados. Entre estas se citan aguas residuales (Funch y Chen, 1975); (Blumenroth, *et al.*, 1997), suelos ácidos (Pradham y Levine, 1995), zonas vadosas (Valentine *et al.*, 1996), aguas y desechos mineros, sedimentos y aguas marinas (Ivanista *et al.*, 1999), sedimentos de lagunas, agua industrial (Lawson, 1997), suelo (Camargo, *et al.*, 2003, Bontidean *et al.*, 2004), lodos activados (Leung, *et al.*, 2001), sedimentos de ríos (Moraga, *et al.*, 2003).

Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal. En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. Tanto los microorganismos resistentes como tolerantes son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes. La resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos (fig 1). Estos fenómenos son:

biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimiosorción mediada por microorganismos.

En la literatura se citan al menos seis mecanismos de resistencia microbiana a los metales pesados (Silver, 1996), que son:(fig 1).

1.- Bombas de flujos que remueven iones tóxicos que entran a la célula mediante sistemas involucrados en el transporte de cationes u oxianiones. Estos pueden ser dependientes o independientes de las enzimas ATPasas (Nies, 1999).

2.- Bomineralización. Los microorganismos son capaces de precipitar metales y radionúclidos como carbonatos e hidróxidos, mediante un mecanismo de resistencia codificado en plásmido. Este mecanismo aparece por el funcionamiento de una bomba que expulsa el metal tóxico presente en el citoplasma hacia el exterior celular en contra de la corriente a un flujo de H^+ hacia el interior celular. Esto produce una alcalinización localizada sobre la superficie celular externa y por lo tanto la precipitación del metal pesado. Otra manera es a través de la formación de sulfuros o fosfatos, como resultado de una actividad enzimática celular. (Vullo, 2003; Lovley, 2000; Gadd, 2000; Sharma et al., 2000; Wang et al., 1997)

3.- Destoxificación enzimática, generalmente son reacciones redox que disminuyen la toxicidad de los iones (Gadd y White, 1993). Un ejemplo de este mecanismo es la biotransformación. Este es un proceso que involucra un cambio químico sobre el metal pesado, como por ejemplo en el estado de

oxidación o metilación. Esta transformación biológica de los metales pesados es mediada por enzimas microbianas pueden dar como resultado compuestos solubles en agua o bien compuestos volátiles. (Vullo, 2003; Srinath et al., 2002).

4.- Bioacumulación en el interior de la célula. Este mecanismo celular involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía. Este consumo energético se genera a través del sistema H^+ -ATPasa. Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, éste es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneínas o también puede ser compartimentalizado dentro de una vacuola, como ocurre en hongos. (Lovley, 2000).

La síntesis de metalotioninas en bacterias constituye un mecanismo posible para explicar los procesos de bioacumulación de metales pesados, y representa una herramienta potencial para el tratamiento biológico de ambientes contaminados por metales. Es por ello que las investigaciones más recientes (Chen et al., 1998), están dirigidas a incrementar la resistencia a metales pesados de varias especies de cianobacterias (*Anabaena* sp., *Synechocystis* sp. y *Synechococcus* sp.), a través de la inserción del gen de la metalotionina de mamíferos (MT-I), que posee mayor capacidad de absorción y acumulación de metales pesados en sistemas acuáticos. (Spain, 2003)

5.- Bioadsorción en su superficie externa de la célula debido a que está cargada negativamente, lo que facilita la adsorción de los cationes metálicos (Lemke,

1993). La bioadsorción se caracteriza por la retención del metal mediante una interacción fisicoquímica del metal con ligandos pertenecientes a la superficie celular. Esta interacción se produce con grupos funcionales expuestos como ejemplo carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo. (Vullo, 2003).

6.- Quimisorción mediada por microorganismos. Son reacciones en donde los microorganismos biomineralizan un metal, formando un depósito primario. Este depósito primario funciona como núcleo de cristalización, con la subsecuente deposición del metal de interés, promoviendo y acelerando así el mecanismo de mineralización.

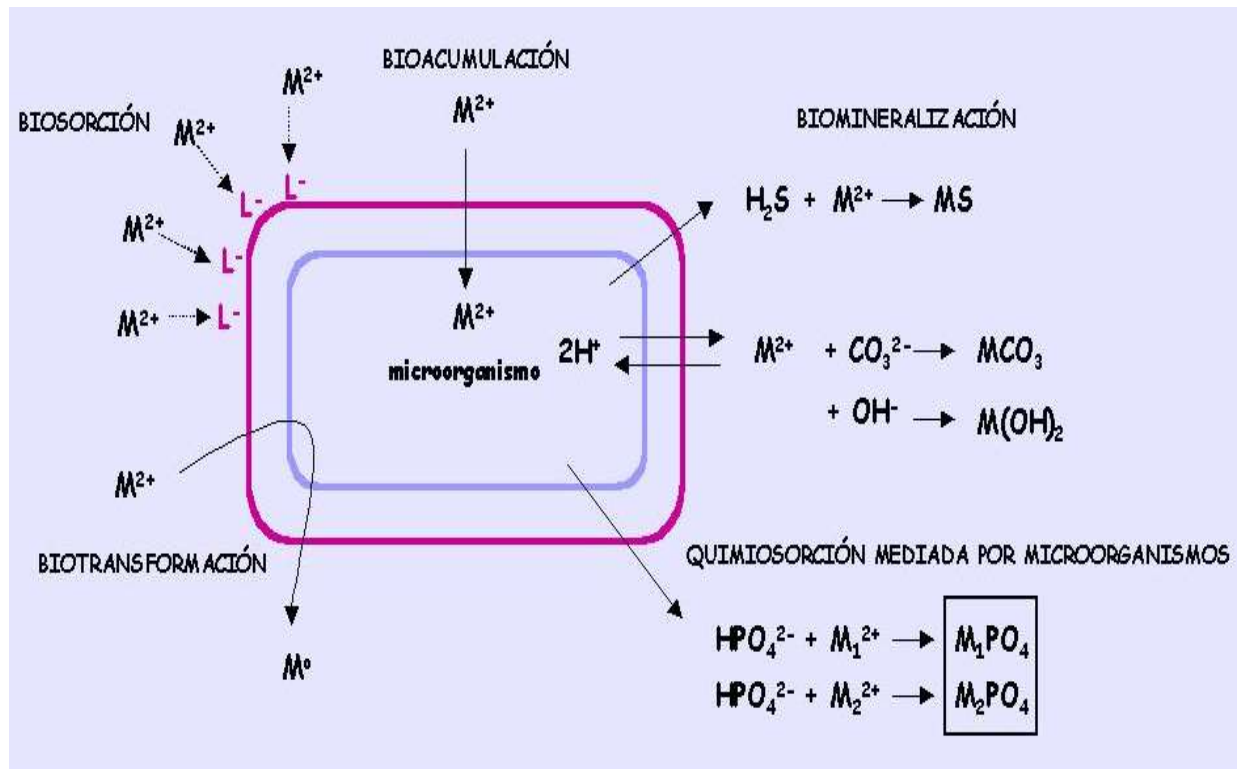


Figura 1. Mecanismos de interacción entre microorganismos y metales pesados (Lovley, 2000.)

uno de los criterios de selección de posibles biosorbentes industriales. Dicha resistencia ha sido evaluada por el método de difusión en agar (Richards, 2002; Gómez *et al*, 1999) y en medio líquido por la determinación de la concentración mínima inhibitoria (Mergeay *et al*, 1985; Gomes *et al*, 2002). La tabla 1, resume la CMI de metales sobre distintos microorganismos. Entre los elementos estudiados se encuentran plomo (Moraga *et al*, 2003), cadmio (Malakul, *et al*, 1998), cobre, zinc y níquel (Diaz Raviña *et al*, 1999, cromo (Mergeay *et al*, 1985), cobalto entre otros.

Otros trabajos sobre resistencia a metales pesados son los realizados por Ivanitsa *et al* (1999), quienes determinaron que bacterias heterótrofas aisladas de ecosistemas marinos (*Pseudomonas* y *Cytophaga*) presentaron diferente grado de resistencia de acuerdo al catión en estudio; el orden de resistencia encontrado fue $Zn > Ni > Fe > Co > Cd$.

Por su parte, Richards *et al* (2002) probaron la sensibilidad a metales pesados de 12 cepas de *Frankia*. En general, todas las cepas fueron sensibles a bajas concentraciones ($< 0.5 \text{ mM.L}^{-1}$) de Ag^{1+} , AsO_2^{1-} , Cd^{2+} , SbO_2^{1-} , y Ni^{2+} .

**TABLA I. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE METALES PESADOS
SOBRE EL CRECIMIENTO DE DIFERENTES MICROORGANISMOS.**

Microorganismo	Metal	CMI mgL ⁻¹	Método de determinación	Referencias bibliográficas
<i>Pseudomonas</i> sp.	Pb (II) Zn (II) Cd (II) Ni (II) Cr (III) Cu (II)	3,200 200 50 800 200 1600	Difusión en Agar	Moraga <i>et al.</i> , (2003)
<i>Alcaligenes</i> sp.	Pb (II) Zn (II) Cd (II) Ni (II) Cr (III) Cu (II)	3,200 200 50 160 200 800	Difusión en Agar	Moraga <i>et al.</i> , (2003)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Zn (II) Cu (II) Pb (II)	4100 380 170	Dilución en tubo	Tietzel (2003)
<i>Streptomyces</i> sp.	Cr (VI)	100	NI	Amoroso <i>et al.</i> , (2001)
<i>B. thuringiensis</i>	Cd (II)	28	NI	El-Helow, <i>et a.,l</i> (2000)
<i>Bacillus</i> sp.	Cd (II)	275	Dilución en tubo	Roane <i>et al.</i> , (1999)
<i>Corynebacterium hoagii</i>	Cr (VI)	1144	NI	Viti <i>et al.</i> , (2003)
<i>Arthrobacter</i> sp y <i>Bacillus</i> sp	Cr (VI)	1000	Difusión en Agar	Megharaj <i>et al.</i> , (2003)
<i>E. coli</i>	Zn (II) Cu (II) Pb (II) Cr (VI) Cd (II) Ni (II)	65.4 63.5 1035 10.4 56.2 60	Difusión en Agar	Spain (2003)
<i>Bacillus</i> sp.	Cr (VI)	500	Difusión en Agar	Camargo <i>et al.</i> , (2003)
<i>Arthrobacter</i> sp	Cr (VI)	500	Difusión en Agar	Camargo <i>et al.</i> , (2003)
Bacterias aisladas de efluentes contaminados con Cr (VI)	Cr (VI)	100	NI	Upreti <i>et al.</i> , (2004)
<i>Frankia</i> sp.	Pb (II) Cr (VI) Cd (II) Ni (II)	1565 165 44 30	Difusión en Agar	Richards <i>et al.</i> , (2002)

**TABLA I. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE METALES PESADOS
SOBRE EL CRECIMIENTO DE DIFERENTES MICROORGANISMOS
(continuación)**

Microorganismo	Metal	CMI mgL ⁻¹	Método de determinación	Referencias bibliográficas
<i>Bacillus</i> sp.	Pb (II) Cr (VI) Cd (II) Ni (II)	621 20 11 12	Difusión en Agar	Richards <i>et al.</i> , (2002)
<i>E. coli</i>	Pb (II) Cr (VI) Cd (II) Ni (II)	414 3 33 12	Difusión en Agar	Richards <i>et al.</i> , (2002)
<i>E. coli</i>	Zn (II) Cu (II)	250 250	Difusión en Agar	Cardonha <i>et al.</i> , (2004)
<i>Penicillium</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Mucor</i> sp.	Pb	1200	Difusión en Agar	González <i>et al.</i> , (2000)
<i>Debaromyces</i> sp. <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Cryptococcus</i> sp. <i>Zygoascus</i> sp. <i>Trichosporon</i> sp.	Pb	1200	Difusión en Agar	González <i>et al.</i> , (2000)

2.4 El uso de microorganismos resistentes o tolerantes a metales pesados

En la literatura se describen al menos tres posibles aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos resistentes o tolerantes a metales pesados: la biominería (biolixiviación), la biorremediación de ambientes contaminados (biosorción), y la utilización de los genes o proteínas reguladoras de la resistencia en el desarrollo de biosensores para detección de la contaminación ambiental. (Nies, 1999).

En bio-minería se usan bacterias resistentes o tolerantes para la recuperación de metales valiosos (Silver 1995).

Se ha reportado que debido a la capacidad de tolerancia a ciertos metales como el hierro el uso bacterias como *Thiobacillus ferrooxidans* para la extracción de dicho metal.

Por otro lado dentro de la perspectiva de la hidrometalurgia, se pueden utilizar estos microorganismos para la recuperación de metales a partir de materiales sólidos contaminados como suelos, cenizas resultantes de quema de desechos, sedimentos acuáticos mediante biolixiviación. Por intermedio de la acción microbiana, los metales presentes en los minerales resultan extraídos en fase acuosa. Tal es el caso de la obtención de Cu por la oxidación de las menas de Cu_2S (calcocita) a Cu SO_4 por intermedio de la acción de las bacterias *Thiobacillus ferrooxidans* y *Thiobacillus thiooxidans*. (Madigan, M.T.2000).

Otra de las aplicaciones de los microorganismos resistentes o tolerantes a metales pesados es la bio-remediación de suelos contaminados. (Pramod *et al.* ,2000)

La biosorción de metales es un proceso de bio-remediación que implica el uso de cultivos puros o mixtos que tengan la capacidad de biotransformar, bioacumular o bioadsorber contaminantes. La biosorción ha sido ampliamente utilizada en la industria para la destoxificación de metales presentes en aguas residuales, la eliminación de materiales radiactivos, recuperación de metales en las minas.

Esta técnica tiene interés industrial porque la eliminación potencial de metales pesados tóxicos procedentes de la disolución de residuos puede conducir a una destoxificación y cura de la descarga ambiental, mientras que un tratamiento posterior de la carga de biomasa puede llevar a recuperar elementos valiosos.

Los mecanismos de biosorción se han determinado como de tipo: complejante, intercambio iónico, quelación, adsorción por fuerzas físicas, entrapamiento en capilares y espacios de los polisacáridos estructurales, esto es llevado a cabo por gradientes de concentración y difusión a través de las paredes y membranas celulares. Debido a la estructura compleja de los microorganismos muchos de los mecanismos de la biosorción aún no son comprendidos. Sin embargo de acuerdo a la dependencia del metabolismo celular los mecanismos se dividen en: dependientes y no dependientes del metabolismo. A su vez da otra clasificación de acuerdo al lugar en la estructura celular donde se lleva a cabo la biosorción; los lugares donde se puede llevar el fenómeno son acumulación-precipitación extracelular, adsorción-precipitación en la superficie celular y acumulación intracelular.

El empleo de biomasa bacteriana se ha aumentado en los últimos años, debido a la habilidad que tienen las bacterias de crecer rápidamente bajo condiciones controladas y a su capacidad de adaptación a disímiles situaciones ambientales (Tsezos, 1999). Entre las especies estudiadas del género *Bacillus* se destaca *B. subtilis* (Cotoras *et al*, 1993), *B. cereus* (Pan y Liu, 2004), *B.*

thuringiensis (El-Helow *et al*, 2000), *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. megaterium* (Srinath, *et al*, 2002), *Bacillus* sp. (Lo *et al.*, 2003), Las bacterias Gram positiva muestran mayores capacidades de enlazar iones metálicos que las bacterias Gram negativa (Beveridge y Fyfe, 1985). Las paredes celulares de las bacterias Gram positiva presentan una gran densidad de cargas negativas en su polímero de peptidoglucano, las cuales son sitios para la unión de los cationes. No obstante también se reportan bacterias Gram negativas con capacidad para tolerar y biosorber metales, tales como *Arthrobacter* sp. *Pseudomonas putida* (Beolchini, 2001).

Algunos investigadores consideran a la biomasa fúngica como el biosorbente más adecuado para la eliminación de metales, ya que los hongos pueden ser cultivados económicamente en grandes cantidades en condiciones ambientales variadas. Además, su pared celular presenta gran capacidad de unión con los cationes metálicos y, a menudo, las células vivas muestran una alta incorporación intracelular de estos (Kuyucak, 1990; Volesky, 1990).

Diversos investigadores han utilizado hongos filamentosos resistentes a metales pesados con este fin, (Erlach y Brierley, 1990; McAfee *et al*, 2001). Entre éstos se encuentran *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp. *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Byschoclamyss* sp., y *Mucor* sp. (Mogollon, *et al.*, 1998), *Rhizopus arrhizus* (Tsezos , 1999). *Rhizopus nigricans*.(S-Bai *et al* , 2001), *Aspergillus niger* (Price *et al.*, 2001), (Mulligan y Galvez-Cloutier, 2003), (Yang *et al.*, 2005), *Rhizopus delemar*, (Tsekova y Petrov G., 2002), *Rhizopus*

arrhizus (Naja, *et al.*, 2005), *Mucor rouxii* (Yan y Viraraghavan, 2003), *Penicillium chrysogenum* (Su, *et al.*, 2003), (Tan y Cheng, 2003), *Aspergillus flavus* (Akar y Tunali, 2005), *Trichoderma viride* (Anand, *et al.*, 2005)

Un análisis de los datos de la literatura muestra que algunas levaduras utilizan la biosorción como mecanismo de resistencia y varios géneros como *Saccharomyces*, *Candida* y *Pichia* pueden ser usados para la remoción de Ag, Au, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, U, Th, Zn. (Aksu y Donmez, G 2001), (Ozer, 2003) (Podgorskii, 2004). También se reporta tolerancia y capacidad de biosorción de plomo, cadmio y plata de *Rhodotorula sp* (Salinas *et al.*, 2000), plata (Gomes, 2002) y de plomo en *Rhodotorula glutinis* (Cho y Kim, 2003)

El conocimiento de los sistemas microbianos de resistencia a metales ha sido en ciencias del ambiente y en medicina molecular. Las principales estrategias mediante las cuales los microorganismos interactúan con los metales y metaloides son: la adsorción en la cubierta celular (Lovley, 2000; Amoroso *et al.*, 2001), los procesos de expulsión membranal (Vargas *et al.*, 1998), la precipitación extracelular (Gazsó, 2001), la acumulación intracelular (Sato y Kondoh, 2002) y las transformaciones redox (McEldowney, 2000).

Los determinantes genéticas de estas interacciones, pueden estar contenidas en el cromosoma (Ackerely *et al.*, 2004) o en los elementos extracromosómicos llamados plásmidos (Cervantes, 1990).

Las proteínas que confieren la resistencia a metales, los mecanismos de regulación genética y los organismos resistentes a metales pesados, son elementos importantes para el diseño en estrategias de biomonitorio de ambientes contaminados con metales pesados. (Corsiber *et al.*, 1999). Se han encontrado determinantes cromosómicos de resistencia a diferentes metales como: el CZC (Co, Zn y Cd), NCC (Ni), CNR (Co y Ni) y CPO (Cu) en *Alcaligenes eutrophus* CH34 aislado de un tanque de decantación de metal de una industria de zinc, Liege, Bélgica. (Mergeay *et al.*, 1985) (Borremans *et al.*, 2001). En *Saccharomyces cerevisiae* se detectaron los genes ZRT1 y ZRT2 que determinan la resistencia a zinc. También en *Enterobacter liquefaciens* C-1 resistente a níquel se encontró el gen NRE (Ni). (Marrero *et al.*, 2004) y la cianobacteria *Synechococcus* PCC 7942 resistente a mercurio presentó el MerR.

Algunos microorganismos contienen las características de resistencia en plásmidos como *Acidocella* sp. GS19h (Ghosh *et al.*, 1997).

Estos elementos genéticos han sido propuestos para la producción de biosensores para el monitoreo de metales pesados. Se han reportado dos tipos de biosensores, uno de ellos está basado en la utilización de la célula completa de microorganismos metal-resistentes a los cuales se les ha incorporado el gen LUX que los capacita para emitir una señal de bioluminiscencia o fluorescencia cuando está presente la forma biodisponible del metal. (Corbisier *et al.*, 1999). Un segundo tipo de biosensor se basa en la interacción directa entre las

proteínas responsables de la unión del metal en la célula (metalothioneinas) y los iones de metales pesados (Bontidean *et al.*, 2000, 2004).

Por lo tanto, debido a los altos niveles de contaminación con metales pesados que se presentan en México y particularmente en Monterrey y su área metropolitana, al impacto que tienen estos metales en la salud del hombre, al daño ecológico y económico causado por la contaminación y dada la importancia del conocimiento y estudio de la microbiota de los ecosistemas con alta contaminación con metales pesados, en este trabajo se aislarán e identificarán microorganismos resistentes a metales pesados a partir de ambientes contaminados con el propósito de obtener una colección microbiana autóctona con valor académico y de investigación y con potencialidad de uso en el campo de la interacción microorganismo – metal.

CAPITULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Origen de las muestras.

Las muestras que se analizaron fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL y se tomaron de zonas donde se vierten aguas y desechos de la industria con altas concentraciones de metales pesados. Entre los sitios muestreados se encuentran los ríos Santa Catarina, San Juan y Pesquería. Además se suministraron muestras de suelo cercano a un pozo petrolero, agua industrial y lodos activados.

3.2 Aislamiento de microorganismos tolerantes a metales pesados.

Se procedió a pesar asépticamente 10g (peso húmedo) de sedimento o lodos, 2g de suelo y se colocaron en 100 mL de solución salina estéril (0.75%). Las muestras se homogenizaron y 5 mL de cada una se inocularon en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL del medio de cultivo caldo de infusión de Cerebro Corazón (BHI) para bacterias y caldo Sabouraud Dextrosa (CSD) para hongos Tabla 2. Los medios preparados fueron esterilizados en la

autoclave a 121 ° C durante 15 minutos, posteriormente los medios líquidos fueron enfriados a temperatura ambiente y los medios sólidos a 42 - 45 °C antes de ser usados en los experimentos.

A cada medio de cultivo se le adicionó el volumen de disolución metálica estéril necesaria para tener una concentración de 50mg.L⁻¹ de cada metal al inicio del experimento. Las sales portadoras de los metales fueron: Pb(NO₃)₂, K₂Cr₂O₇, CdSO₄.8H₂O, CuSO₄ anhidro, ZnSO₄.7H₂O y NiSO₄.7H₂O . Las disoluciones se esterilizaron por el método de filtración (membranas de nitrocelulosa con diámetro de poro de 0,45 µm). Cada muestra fue sembrada por triplicado. Los cultivos de bacterias y hongos se incubaron a temperatura ambiente con agitación de 120 r.min⁻¹, durante 10 días. Una vez obtenido crecimiento se aplicó la técnica de purificación en medio sólido.

Para el aislamiento y purificación se utilizaron los medios sólidos agar BHI para las bacterias y agar Saboraud para hongos filamentosos y levaduras, aplicando la técnica de dilución y siembra en placa (Madigan, *et al.*, 2000), sobre placas de Petri con 15mL de medio selectivo sólido suplementado con cada metal (50 mg.L⁻¹). Las placas fueron incubadas durante 10 días, a 35⁰C y 28⁰C, para bacterias y hongos, respectivamente. Posteriormente, se procedió al aislamiento de las colonias. Las colonias aisladas se transfirieron a tubos con agar inclinado con adición de los metales. La pureza de los cultivos de ambos microorganismos fue confirmada por observaciones culturales, morfológicas y para el caso de bacterias se aplicó la tinción de Gram. Los cultivos puros

fueron conservados según el método tradicional en el refrigerador a 4 °C con subcultivos regulares cada tres meses.

TABLA II. MEDIO DE CULTIVOS PARA EL AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE BACTERIAS Y HONGOS.

Componente	Concentración
Caldo BHI	gL ⁻¹
Sustrato alimenticio (extracto de cerebro, extracto de corazón y peptona)	27,5
D(+)-glucosa	2,0
Cloruro sódico	5,0
Hidrogenofosfato <i>di</i> -sódico	2,5
Caldo Saboraud	
Peptonas	10,0
D(+)-glucosa	40,0

Nota: Para prepara los medios sólidos se añade agar 15,0 (gL⁻¹) .

3.3 Determinación de la resistencia a la presencia de los metales Pb(II), Cr(VI), Cd(II), Cu(II), Zn(II) y Ni(II).

3.3.1 Preparación del inóculo

3.3.1.1 Bacterias

Los cultivos puros de bacterias se sembraron en agar-BHI para obtener suficiente crecimiento. Utilizando una asa bacteriológica se prepararon matraces con 50 mL de suspensión bacteriana entre 1×10^6 - 1×10^7 células por mL. Para realizar el conteo de bacterias se utilizó la técnica de dilución y siembra en placa, NOM-092-SSA1-1994.

3.3.1.2 Técnica de dilución y siembra en placa.

A partir del crecimiento bacterial en placa se suspendieron varias colonias en 50 mL de buffer de fosfatos y se compararon visualmente con un patrón 0.5 de McFarland Estándar (concentración bacteriana 150×10^6).

De la suspensión bacterial se realizaron diluciones decimales adicionales, las diluciones se obtuvieron al mezclar un mL del volumen en nueve veces un diluyente (buffer de fosfatos) cada repetición de esta operación se inoculó en los medio de cultivos.

Se contaron las colonias, que se desarrollan en el medio de elección después de 48 h a 35°C presuponiendo que cada colonia proviene de una célula bacteriana de la muestra bajo estudio.

3.3.1.3 Hongos

a) Levaduras

Las cepas aisladas se sembraron en agar Saboraud 4% glucosa para obtener suficiente crecimiento. Utilizando una asa bacteriológica se prepararon matraces con 50 mL de suspensión de levaduras ente 1×10^6 - 1×10^7 células por mL. Se utilizó la técnica de dilución y siembra para su conteo. NOM-110-SSA1-1994.

b).-Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos se sembraron en agar Saboraud 4 % glucosa hasta obtener suficiente crecimiento en placa. Posteriormente se les añadió a la caja

petri con la cepa 1 ml de agua estéril para obtener las esporas raspando la superficie de la colonia con un agitador de vidrio y finalmente vaciarlas a un matraz con 99 ml de agua estéril para posteriormente hacer el conteo de esporas en la cámara de Neubauer.

3.3.1.4 Conteo de esporas.

Se utilizó la técnica de la cámara de Neubauer, fig.2. Es una cámara de conteo celular en el que se coloca una muestra de la suspensión a medir. El dispositivo presenta unas señales que determinan un volumen conocido (x microlitros). Al contar bajo el microscopio el número de partículas presentes en ese volumen se puede determinar la densidad de partículas en la suspensión de origen.

Se contaron las cuatro áreas sombreadas (L) observando un total de x células entre las cuatro áreas, la concentración en la suspensión celular será:

$$\text{Concentración en la suspensión (células / mL)} = 10000 (x/4)$$

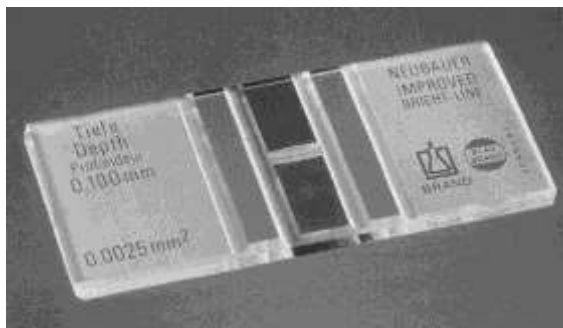


Figura 2. Cámara de conteo celular.

3.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de plomo(II), cobre(II), cadmio(II), zinc(II), níquel (II) y cromo (VI).

La resistencia a la presencia de los metales fue demostrada mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Ésta fue realizada utilizando la técnica de dilución en tubo para lo cual se prepararon baterías de tubos con 5 mL de caldo Luria Bertani (LB) (Tabla III) esterilizado en el autoclave a 121 ° C durante 15 minutos, posteriormente enfriados a temperatura ambiente. Los medios fueron suplementados con disoluciones de los metales estériles a concentraciones crecientes desde 100 hasta 3800 mg.L⁻¹. Cada batería se inoculó con 1mL de 1x10⁶ células. mL⁻¹ de la cepa correspondiente y se incubaron en condiciones estáticas a temperatura de 35⁰C (bacterias), 28°C (hongos) . El crecimiento de las bacterias y hongos fue seguido durante varios días (Tabla IV), con observaciones diarias con el objetivo de determinar la turbidez y la producción de micelio y esporulación, respectivamente.

Trascurrido este periodo de tiempo, se determinó la concentración celular por el método de conteo de células viables (bacterias) y peso seco (hongos).

Los resultados fueron comparados con un control positivo (medio sin adición de metal). Se realizaron tres réplicas de cada experimento.

La CMI se determinó como la concentración mínima del elemento metálico que inhibió el crecimiento microbiano (Madigan *et al*, 2003).

TABLA III.- MEDIO LURIA BERTANI

Componente	Concentración gL ⁻¹
Triptona	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g

TABLA IV. CONDICIONES GENERALES PARA LAS PRUEBAS DE RESISTENCIA

Pruebas de resistencia	Medio de cultivo	Tiempo	Concentración de los metales mgL ⁻¹
<i>Hongos filamentosos</i>	Caldo Luria Bertani	7 días	200,400,600,800,1000, 1200,1600,2000,2400,2800,3200,3600, 3800
<i>Levaduras</i>	Caldo Luria Bertani	7 días	200,400,600,800,1000,1200
<i>Bacterias</i>	Caldo Luria Bertani	5 días	200,400,600,800,1000,1100

3.5 Identificación de microorganismos resistentes a metales pesados.

3.5.1 Bacterias.

Las bacterias aisladas y purificadas en agar BHI, fueron identificadas atendiendo a las características morfológicas y culturales de las colonias y a características microscópicas así como las pruebas bioquímicas.

Las pruebas bioquímicas se realizaron por el método tradicional y mediante el sistema de identificación BBL Cristal para las bacterias Gram positivas y el API-20 E (Active Pharmaceutical Ingredients) para las bacterias Gram negativas. Después de interpretadas las pruebas bioquímicas de estos dos sistemas de identificación se definió el número del código correspondiente para cada aislado y se comparó con la base de datos del índice de taxones según casa comercial (Biomerieux).

3.5.2 Criterios morfológicos usados para la identificación de bacterias.

Características de las colonias:

Tamaño: diámetro en mm.

Forma: puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, como huso.

Elevación: plana, sobreelevada, convexa, pulvinada, umbonada, umbilicada.

Margen (borde de la colonia): entero, ondulante, lobulado, lacerado, filamentoso, rizado.

Color: blanco, amarillo, negro, marrón, anaranjado.

Superficie: brillante, opaca.

Densidad: opaca, translúcida, trasparente.

Consistencia: mantecosa, viscosa, membranosa, quebradiza.

(Koneman, *et.al.* 1997).

Características microscópicas

Morfología y agrupación celular, respuesta a la tinción de Gram, presencia de estructuras como cápsulas, flagelos (motilidad), formación y ubicación de esporas.

3.5.3 Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias

3.5.3.1.1 Método tradicional

De acuerdo a las características macroscópicas y microscópicas se seleccionaron algunas pruebas bioquímicas para diferenciar los géneros bacterianos entre las que se encuentran:

Presencia de esporas, motilidad , catalasa, oxidasa, hemólisis, producción de sulfuro de hidrógeno, fermentación de glucosa, maltosa y sacarosa, salicina, manitol, indol, urea, utilización de citrato, Voges –Proskauer y coagulasa.

3.5.3.1.2 Métodos rápidos

3.5.3.1.2.1 Sistema BBL CRYSTAL

Es un método de identificación en miniatura que utiliza substratos convencionales. Diseñado para la identificación de bacterias Gram-positivas.

El equipo incluye tapas del panel, bases y tubos con fluido de inóculo.

Principios del Procedimiento:

Los paneles del sistema BBL Cristal contienen 29 substratos bioquímicos y enzimáticos deshidratados. Para hidratar los sustratos se utiliza una suspensión de bacterias en el líquido de inóculo con la siguiente fórmula: {KCl 7.5g, CaCl₂ 0.5g, Tricina N-[2-hidroxi-1,1-bis (hidroximetil) metil] glicina 0.895 g, agua purificada a 1000 ml}. Las pruebas usadas en el sistema se basan en la utilización y degradación microbiana de substratos específicos detectados por varios sistemas indicadores. La hidrólisis enzimática de los substratos fluorógenos que contienen derivados cumarínicos del 4-metil-umbeliferona (4 MU) o del 7-amino-4-metilcumarín (7-AMC) resulta un aumento de la fluorescencia que se detecta fácilmente a simple vista con una lámpara de luz ultravioleta. Los substratos cromógenos, después de sufrir hidrólisis, producen cambios de color que pueden detectarse visualmente.

Los principios de las pruebas usadas en el sistema BBL- CRISTAL se observan en el apéndice A.

3.5.3.1.2.2 Sistema API 20

Es un sistema para la identificación de enterobacterias y otros bacilos Gram negativos no exigentes que utiliza 23 tests bioquímicos estandarizados y miniaturizados. Es un sistema aceptado por la Secretaría de Salud.

El API 20 E consta de 20 microtubos conteniendo substratos deshidratados. Estos tests se inoculan con una suspensión bacteriana la cual hidrata el medio durante la incubación a 35°C por 24 h. Después del tiempo se producen cambios de color espontaneos o revelados por la adición de reactivos.

La lectura de las reacciones se hace de acuerdo con la tabla de Lectura y la identificación mediante el API 20E Index o el programa informático para identificación.

Los principios de las pruebas usadas en el sistema API 20E se observan en el apéndice B.

3.5.4 Hongos

3.5.4.1 Levaduras.

La identificación del género de levaduras se basó en el Esquema de Identificación para levaduras comunes (Koneman, et al. 1997)

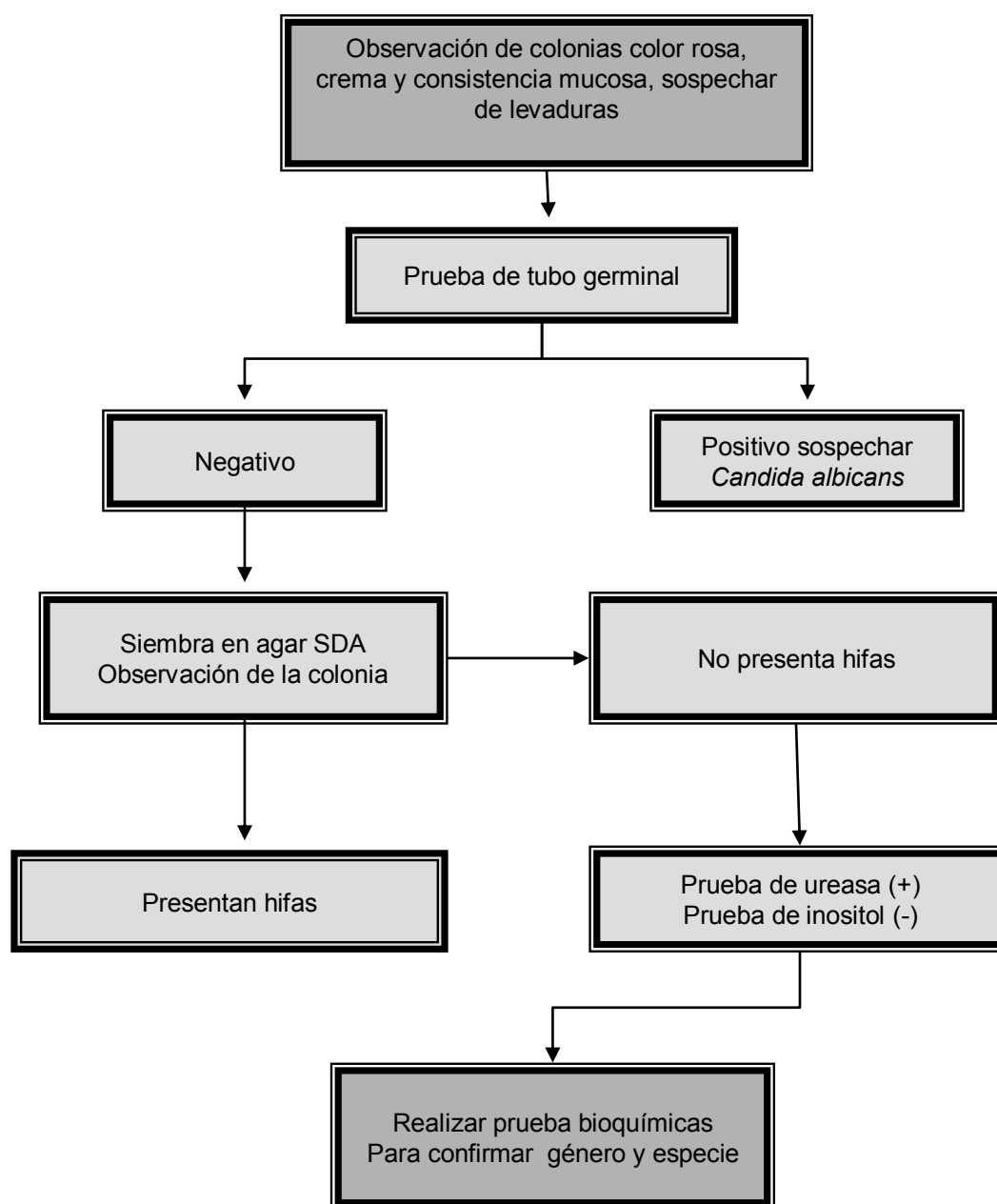


Figura 3. Esquema de Identificación de levaduras

Finalmente se realizarán pruebas bioquímicas convencionales para identificar el género y especie de las levaduras aisladas. Los resultados se compararon con lo reportado en la bibliografía (Koneman, et al. 1997).

3.5.4.2 Hongos Filamentosos.

La ubicación taxonómica de los hongos filamentosos se basó en la caracterización de los cultivos puros según características culturales de las colonias y observaciones de preparaciones en fresco en lactofenol y de microcultivos para definir las características de hifas, esporas y estructuras especializadas de las cepas. Posteriormente se consultaron los manuales de identificación (Barnett y Hunter ,1999; Barnett *et al*, 2000).

3.5.5 Identificación microscópica

3.5.5.1 Preparación en fresco

Se colocó sobre un portaobjetos una gota de solución de lactofenol, se tomó el material a observar en una mínima cantidad con lancetas procurando arrancarlo desde la base y disponerlo con cuidado sobre la gota de uno de los portaobjetos.

Se transportó el material con otra la lanceta a la gota de un segundo portaobjetos para la observación microscópica definitiva.

Se colocó el portaobjetos poco a poco y empezando por un lado para evitar que se formaran burbujas entre los dos vidrios.

3.5.5.2 Preparación del microcultivo

En un portaobjetos se depositó en forma aséptica una gota de agar SDA. Después se siembra el hongo pasando el asa bacteriológica en la periferia superior del medio de cultivo, en seguida se colocó un cubreobjetos estéril. Esta preparación se pone sobre un algodón con agua estéril dentro de una caja petri (cámara húmeda); finalmente se incubó a temperatura ambiente. Después de 3-4 días se retiró cuidadosamente el cubreobjeto en el cual quedó adherido el hongo y se preparó en un portaobjeto para observar en fresco en un microscopio marca ZEISS Estándar 25 en el objetivo 40X. Se tomaron fotografías y los resultados se compararon con lo reportado en bibliografía. (Barnett y Hunter, 1999), (Barnett, *et al.* 2000), (Koneman, *et al.* 1997).

3.5.6 Criterios morfológicos para identificación de hongos filamentosos.

Tipo de hifa: septadas o no septadas, lisas o rugosas, mono o multi nucleadas

Tipo de micelio: transparente u oscuro, coloreado o incoloro, corto o largo.

Tipo de esporas asexuales: esporangiosporas, artrosporas, blastosporas conidios o clamidosporas.

-Características de Estructuras Especializadas: esporangio, esporangióforo, rizoides, conidióforos, conidios.

3.5.7 Pruebas preliminares para la remoción de los metales Pb(II), Cr(VI), Cd(II), Cu(II), Zn(II) y Ni(II).

Se produjo biomasa (tabla 5 y 6) de los aislados que presentaron niveles elevados de CMI a los seis cationes metálicos, se procedió a determinar el porcentaje de remoción de cada uno de los metales en estudio. Para esto se pesaron 10 mg de biomasa de cada microorganismo y se pusieron en contacto con 10mL de las disoluciones de 60 mgL⁻¹ de plomo(II), cobre(II), níquel(II), cadmio(II), zinc(II) a pH 4.5 y cromo(VI) a pH 2, durante 16h (Volesky, 1999). Posteriormente las suspensiones fueron centrifugadas a 1200 (g), se separó la biomasa, y se determinó la concentración de metal residual al sobrenadante mediante la técnica de Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA), utilizando un Espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Varian modelo GBC932AA y de acuerdo a la NOM-AA-51-1981 referido en Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (Greenberg et al, 1992). Se realizaron tres réplicas de cada experimento.

TABLA V. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE HONGOS

Compuesto	Cantidad
Sacarosa	40gL ⁻¹
K ₂ HPO ₄	5.5 gL ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.75 gL ⁻¹
NH ₄ Cl	2.5 gL ⁻¹
Cisteína	0.6 gL ⁻¹
Extracto de levadura	1.5 gL ⁻¹

(Lemke, 1993; Treen-Sears 1986; Volesky, 1994).

TABLA VI. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE BACTERIA

Componente	[gL⁻¹]
Glucosa	25
K ₂ HPO ₄	5.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0
Cisteína	0.6
Extracto de levadura	1.0

(Puranik y Paknikar,1999; Beveridge y Murray,1980; Simmons y Singleton,1996).

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento de los microorganismos autóctonos resistentes o tolerantes a metales pesados

En la bibliografía se refieren gran diversidad de trabajos donde se señala que los territorios con mayor contaminación con metales pesados son los sitios más adecuados para encontrar reservorios o nichos de microorganismos autóctonos con resistencia sobresaliente a metales tóxicos debido a que han sobrevivido a estas condiciones de estrés.

Varios de estos lugares son: zonas mineras, (Dave y Natarajan, 1987; Silóniz et al, 1991), lodos activados (Leung et al, 2001), sedimentos de ríos (Amoroso, 2001; Moraga et al, 2003), suelo (Camargo et al, 2003, Bontidean et al, 2004), aguas de la industria procesadora de hidrocarburos (Funch y Chen, 1975; Blumenroth y Boseker, 1997), aguas termales enriquecidas con metales pesados, vertederos de residuos generados por las plantas de energía(Lawson, 1997), entre otros. Los territorios de las plantas fundidoras como la de Peñoles en México la empresa Pigmentos y Óxidos en Monterrey, N.L. (Valdés Perezgasga, 1999) son dos de las áreas de importancia para el estudio de los ecosistemas así como de los ríos que reciben importantes descargas de agua y

de sólidos de la industria los cuales cambian de manera importante los entornos, alterando la flora microbiana de la región.

Para el aislamiento de los microorganismos se utilizaron muestras tomadas de áreas muy afectadas por la contaminación con metales pesados: sedimentos de ríos Santa Catarina, San Juan y Pesquería ubicados en Monterrey y su área metropolitana, aguas de desecho industrial, lodos activados y suelo de una refinería de petróleo.

En los medios de cultivo utilizados para bacterias (caldo BHI), hongos (Caldo SD) se observó abundante crecimiento en presencia de 50 mgL^{-1} de Pb (II), Zn (II) y Cu (II), en menor grado en Ni (II) y Cd (II) y muy poco en Cr (VI). Después del enriquecimiento, aislamiento y purificación se obtuvieron 53 aislados microbianos: 17 de bacterias, 34 de hongos filamentosos y dos de levaduras (Fig. 4).

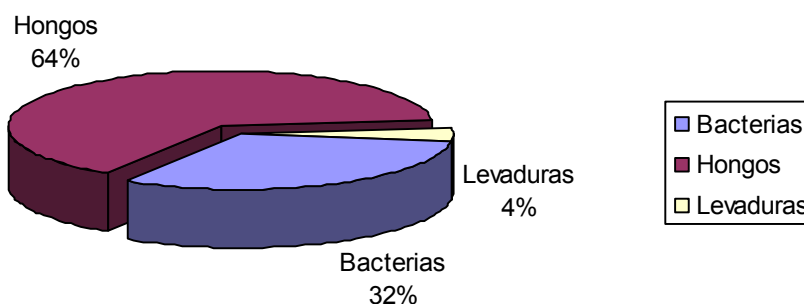


Figura 4. Distribución porcentual de los grupos microbianos aislados en presencia de 50 mg.L^{-1} de plomo (II), cromo (VI), cadmio (II), cobre (II), zinc (II) y níquel (II)

La figura 4 muestra que los hongos filamentosos fue el grupo de mayor incidencia contribuyendo con un 64% del total de los aislados, luego las bacterias con un 32 % y finalmente las levaduras con 4 %.

Esta distribución coincide con la obtenida por Garza-González (2005) quien además de bacterias y hongos aisló algas verdes con resistencia multimetálica. Sin embargo, difiere de la informada por González *et al* (2000) quienes aislaron de muestras de suelos de la zona de Henares (Madrid, España), 120 microorganismos resistentes a plomo, 71 de los cuales fueron bacterias, 32 hongos filamentosos y 17 levaduras. También difieren de los resultados de Gómez *et al* (2002) quienes aislaron un mayor número de bacterias que de hongos de suelos níquelíferos cubanos.

La diversidad microbiana encontrada en este trabajo fue el resultado de la acción de varios factores: características fisicoquímicas de las muestras (estado físico, grado de humedad y pH), tipos de metales contenidos en ésta, temperatura del ecosistema, características fisiológicas y genéticas de los microorganismos, capacidad de los microorganismos para crecer fuera de su ambiente natural.

En las seis muestras procesadas (RP, RSJ, RSC, AI, LA y T) se encontraron representantes de bacterias y hongos filamentosos; a diferencia de las levaduras que se aislaron de dos (sedimento de RP y AI). La muestra que aportó mayor número de aislados fue la de tierra, con 3 bacterias y 21 hongos filamentosos, para un 47.2 % del total de estos aislamientos. Las muestras de donde se aislaron representantes de los 3 grupos microbianos (bacterias, hongos filamentosos, levaduras) fueron sedimento de río Pesquería y agua industrial. Tabla VII.

TABLA VII. RELACIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE AISLADOS CAPACES DE CRECER EN PRESENCIA DE 50 MG.L⁻¹ DE PLOMO (II), CROMO (VI), CADMIO (II), COBRE (II), ZINC (II) Y NÍQUEL (II) Y FUENTES DE AISLAMIENTO.

Fuente de aislamiento	Aislados de Bacterias	Aislados de hongos filamentosos	Aislados de Levaduras
R. Pesquería (SRP)	3	3	1
R.S. Juan (SRSJ)	2	2	
R. Sta. Catarina (SRSC)	2	2	
Agua Industrial (AI)	5	4	1
Lodo Activado (LA)	2	3	
Tierra (T)	3	21	

Los hongos filamentosos toleran un mayor espectro de humedad, presión osmótica, pH que las bacterias (Madigan *et al.*, 2000). Por otra parte, el suelo constituye un sustrato natural por excelencia para la vida microbiana, ya que suministra fuentes nutricionales orgánicas e inorgánicas a los microorganismos que lo colonizan, además sus características físicas y químicas benefician las condiciones ecológicas para el desarrollo de un elevado número de microorganismos con gran versatilidad nutricional.

La mayor parte de los aislados fueron obtenidos en medios suplementados con plomo, (49%) y zinc (22.6%), lo que refleja el efecto de la presencia de estos contaminantes en los sitios de muestreo sobre la selección de su microbiota, como se muestra en la tabla VIII.

TABLA VIII. RELACIÓN DE AISLADOS DE BACTERIAS (B), HONGOS FILAMENTOSOS (HF) Y LEVADURAS (L) OBTENIDOS EN MEDIOS DE CULTIVO SUPLEMENTADOS CON 50 MG L⁻¹ DE CADA METAL.

Metal	Cr (VI)		Cu (II)	Cd (II)		Zn (II)		Ni (II)		Pb (II)		
Microorganismo	B	HF	HF	B	HF	B	HF	B	HF	B	HF	L
Total	1	2	3	2	3	4	8	1	3	9	15	2
%	6	6	8.8	11.8	8.8	23.5	23.5	6	8.8	53	44	100

En la tabla VIII se observa que en medios suplementados con plomo fueron aislados el 53% del total de las bacterias aisladas, el 44 % de los hongos filamentosos y el 100% de las levaduras.

Los resultados anteriores revelan una adaptación de los microorganismos a contaminantes como el plomo, el cual ha sido ampliamente utilizado en la industria de Monterrey y su área metropolitana desde décadas atrás. El estudio de la microbiota de estos ecosistemas contribuirá a enriquecer el conocimiento ecológico de otros ambientes contaminados con metales pesados, de características similares a las de los investigados y demostrar su gran diversidad microbiana.

De los 53 aislados microbianos obtenidos se encontraron únicamente diez aislados de las bacterias doce de hongos filamentosos y dos de levaduras presentó multi-resistencia metálica, es decir fueron capaces de crecer abundantemente en presencia de cada uno de los seis metales en estudio.

4.2 Determinación de los niveles de resistencia a plomo (II), cromo (VI), cadmio (II), cobre (II), zinc (II) y níquel (II).

Para definir el espectro de resistencia de los 24 aislados microbianos que presentaron resistencia multimetálica (diez bacterias, doce hongos filamentosos y dos levaduras) se procedió a determinar la CMI de los metales en estudio para los microorganismos seleccionados

La CMI es un aspecto necesario en la caracterización de microorganismos con potencialidad de uso en el saneamiento de ambientes contaminados con metales. El método de difusión en agar ha sido el más utilizado con este fin

(Gómez *et al*, 1999; Moraga *et al*, 2003; Spain, 2003, Camargo *et al*, 2003). Sin embargo, este método presenta desventajas debido al carácter oligodinámico de los metales (Madigan *et al*, 2003), lo cual interfiere en el encuentro metal-microorganismo. Esto fue demostrado por Gómez *et al*, 2002 al comparar la resistencia de aislados de microorganismos del yacimiento níquelífero de Moa (Cuba).

Los resultados de las CMI (s) de plomo(II), cromo(VI), cadmio(II), zinc(II), níquel(II), y cobre(II) de los aislados de las 6 muestras de Monterrey demuestran la interacción ambiente-genotipo (Schmitd y Schlegel, 1994; Nies, 1999; Spain, 2003; Marrero *et al*, 2004), y se presentan en las tabla IX, X y XI.

TABLA IX. CRECIMIENTO DE BACTERIAS EN MEDIOS CON PLOMO (II), CROMO (VI), CADMIO (II), COBRE (II), ZINC (II) Y NÍQUEL (II).

Bacteria	Fuente de aislamiento	CMI mgL ⁻¹	Cr (VI)	Cu (II)	Cd (II)	Zn (II)	Ni (II)	Pb (II)
a	T	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		200	+	++	+	+++	+++	+++
		300	-	+	-	++	++	+++
		400	-	+	-	+	-	+++
		500	-	+	-	+	-	++
		600	-	-	-	-	-	+
		800	-	-	-	-	-	-
k	AI	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		200	++	+++	++	+++	++	+++
		300	++	+++	++	+++	++	++
		400	++	+++	++	+++	+	++
		500	+	++	+	++	+	++
		600	-	+	-	++	-	+
		800	-	+	-	++	-	+
		1000	-	-	-	+	-	+
		1100			-	-	-	-
q	LA	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		200	++	+++	+++	+++	++	+++
		300	++	+++	++	+++	++	+++
		400	++	+++	++	+++	+	++
		500	+	++	+	++	+	++
		600	-	++	-	+	-	++
		800	-	++	-	+	-	+
		1000	-	++	-	+	-	+
		1100	-	+	-	-	-	-
		1200	-	-	-	-	-	-
o	AI	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		200	+	+++	+	++	++	++
		300	-	+++	+	+	+	++
		400	-	++	-	-	-	++
		500	-	+	-	-	-	+
		600	-	-	-	-	-	+
		800	-	-	-	-	-	-
c	SRP	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		200	++	+++	++	+++	+++	+++
		300	+	++	++	+++	+++	+++
		400	+	+	++	++	++	+++
		500	-	+	-	+	+	++
		600	-	-	-	-	-	+

		800	-	-	-	-	-	-
Bacteria	Fuente de aislamiento	Concentración mgL ⁻¹	Cr (VI)	Cu (II)	Cd (II)	Zn (II)	Ni (II)	Pb (II)
d	LA	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		200	++	+++	++	+++	+	+++
		300	-	+++	++	+++	+	++
		400	-	++	+	++	-	++
		500	-	-	+	+	-	+
		600	-	-	-	-	-	-
h	T	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		200	++	+++	+	+++	+	++
		300	+	+++	+	+++	+	++
		400	-	+++	+	++	+	++
		500	-	++	+	++	-	+
		600	-	-	-	-	-	-
f	AI	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		200	++	+++	++	+++	+++	+++
		300	++	+++	++	+++	+++	+++
		400	++	+++	++	++	+++	++
		500	+	++	++	++	++	+
		600	-	+	+	++	++	+
		800	-	+	+	+	+	+
		1000	-	-	-	-	-	-
w	AI	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		200	++	+++	+++	+++	+	+++
		300	-	+++	+	+++	+	++
		400	-	++	-	++	-	+
		500	-	+	-	++	-	+
		600	-	-	-	-	-	-
t	T	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		200	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		300	++	+++	++	+++	++	++
		400	+	++	++	+++	+	++
		500	+	+	+	++	+	+
		600	-	+	+	+	+	+
		800	-	-	-	-	-	-

Nota: De tres réplicas de cada experimento se calcularon las medias y se utilizó el siguiente criterio:

- (++++) Muy Abundante turbidez, 6.5×10^7 UFC/mL
- (+++) Abundante turbidez, 4.4×10^7 - 3.8×10^6 UFC/mL
- (++) Regular turbidez, 1.9×10^6 - 4.3×10^6 - UFC/mL
- (+) Escasa turbidez $< 1.8 \times 10^6$ UFC /mL
- (-) No hubo crecimiento

La tabla IX señala a las bacterias k, q, f y t como las de mayor resistencia ya que crecieron en presencia de concentraciones mayores a 500 mgL^{-1} de cada uno de los seis metales en estudio.

Las fuentes que aportaron estos microorganismos fueron agua industrial (aislados k y f), lodo activado (aislado q) y tierra (aislado t).

El 20 % de los aislados bacterianos presentaron CMI de plomo y zinc superiores o iguales a 1000 mgL^{-1} y el 10% de cobre. No obstante el 100% presentó CMI de plomo (II) de 500 mgL^{-1} , el 90% de cobre(II) y zinc(II), el 60% de cadmio(II), el 50% de níquel(II) y el 40% cromo (VI).

TABLA X. CRECIMIENTO DE HONGOS FILAMENTOSOS EN MEDIOS CON PLOMO (II), CROMO (VI), CADMIO (II), COBRE (II), ZINC (II) Y NÍQUEL (II).

Hongo	Fuente de aislamiento	Concentración mgL ⁻¹	Cr (VI)	Cu (II)	Cd (II)	Zn (II)	Ni (II)	Pb (II)
M	T	0	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
		200	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		400	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		800	+++	++++	+++	++++	++++	++++
		1200	-	++++	++	++++	++++	++++
		1600	-	++++	+	++++	+++	+++
		2000	-	+++	+	++++	+++	+++
		2400	-	++	-	+++	++	+++
		2800	-	++		+++	++	++
		3200	-	+		++	+	++
		3600	-	-	-	+	-	+
		3700	-	-	-	-	-	-
AA	SRSC	0	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
		200	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		400	++++	++++	+++	++++	++++	++++
		800	+++	++++	+	++++	++++	++++
		1200	+++	++++	-	++++	+++	++++
		1800	+	++	-	++	+	++
		2200	+	++	-	++	+	++
		2800	-	+	-	+	+	+
		3000	-	+	-	+	-	+
		3200	-	-	-	-	-	-
P	SRP	0	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
		200	++++	++++	++++	++++	+++++	++++
		400	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		800	++++	++	+++	++++	++++	++++
		1200	+++	-	+	+++	+++	++++
		1400	++	-		+++	++	++++
		1800	-	-	-	+	-	+
		2000	-	-	-	-	-	-

Hongo	Fuente de aislamiento	Concentración mgL ⁻¹	Cr (VI)	Cu (II)	Cd (II)	Zn (II)	Ni (II)	Pb (II)
B	AI	0	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
		200	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		400	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		800	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		1200	++++	+++	++	++++	++++	++++
		1600	+++	++	++	++++	+++	++++
		2000	+++	++	+	++++	+++	++++
		2400	++	+	+	+++	++	++++
		2800	++	+	-	+++	+	+++
		3000	+	-	-	+++	-	+++
		3400	+		-	++	-	++
		3600	-	-	-	++	-	++
		3700	-	-	-	+	-	+
		3800	-	-	-	-	-	-
H	SRP	0	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
		200	+	++++	++++	++++	++++	+++
		400	+	++++	++	++++	++++	++
		600	-	++++	-	++++	++++	-
		1000	-	++++	-	++++	++++	-
		1400	-	++	-	+++	++	-
		1600	-	+	-	+	-	-
		1700	-	-	-	-	-	-
J	T	0	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
		200	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		400	++++	++++	+++	++++	++++	++++
		800	+++	++++	++	++++	++++	++++
		1000	++	++++	-	++	+	++
		1200	-	++	-	+	-	+
		1300	-	-	-	-	-	-
B	T	0	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
		200	++++	++++	++++	++++	+++++	++++
		400	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		800	++	++++	+++	++++	++++	++++
		1000	-	++++	++	++++	++++	+++
		1400	-	++	+	+++	+++	+++
		1800	-	+	-	++	++	++

		2000	-	-	-	+	-	+
		2100	-	-	-	-	-	-
Hongo	Fuente de aislamiento	Concentración mgL ⁻¹	Cr (VI)	Cu (II)	Cd (II)	Zn (II)	Ni (II)	Pb (II)
E	AI	0	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
		200	++	++++	++++	++++	++++	+
		400	+	++++	+	++++	+++	+
		600	-	+++	-	+++	+	-
		800	-	+	-	+++	-	-
		1000	-	-	-	++	-	-
		1200	-	-	-	-	-	-
X	T	0	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
		200	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		400	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		800	+++	+	++++	+++	++++	++++
		1200	++	-	++	++	+++	+++
		1400	+	-	+	++	++	++
		1600	-	-	-	++	-	++
		1800	-	-	-	+	-	+
		1900	-	-	-	-	-	-
DD	SRP	0	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
		200	++++	++++	++++	++++	+++++	++++
		400	++	++++	++++	+++	++	++++
		800	+	++	++++	++	+	++++
		1000	-	+	++	++	-	+++
		1400	-	-	+	++	-	++
		1600	-	-	+	+	-	++
		1700	-	-	-	-	-	-
Y	SRP	0	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
		200	++	++++	+++	++++	+	++++
		400	+	++++	+	+	+	++++
		600	-	+	-	-	-	++++
		800	-	-	-	-	-	++
		1000	-	-	-	-	-	++
		1200	-	-	-	-	-	-

Nota: De tres réplicas de cada experimento se calcularon las medias y se utilizó el siguiente criterio:

- (+++++) Muy abundante formación micelial y esporulación. 14 mg mL^{-1} (peso seco)
- (++++) Abundante formación micelial y esporulación $13\text{-}13.9 \text{ mg mL}^{-1}$ (peso seco)
- (+++) Regular formación micelial y esporulación $10\text{-}12.9 \text{ mg mL}^{-1}$ (peso seco)
- (++) Regular formación de micelio y escasa esporulación $8.2\text{-} 9.9 \text{ mg mL}^{-1}$ (peso seco)
- (+) Escasa formación de micelio sin esporulación $\text{mg mL}^{-1} > 8 \text{ mg mL}^{-1}$ (peso seco)
- (-) No hubo crecimiento

En la tabla X se observa que siete aislados fueron capaces de crecer en concentraciones mayores a 800 mgL^{-1} de cada uno de los seis metales estudiados. Ellos fueron el M, B y X obtenidos de tierra, el DD y P aislados de sedimento de río Pesquería, el B de agua industrial y el AA de sedimento de río Santa Catarina. La máxima concentración tolerada fue de $3,600 \text{ mgL}^{-1}$ de plomo (II) y de zinc (II).

El 73% de los aislados presentaron CMI de zinc, níquel y plomo mayor o igual a 1000 mg L^{-1} , el 63% de cobre, el 27% de cadmio y cromo.

Los aislados que mostraron mayor resistencia a Cu, Cd, Zn y Pb fueron B, M, AA, J, V, R, X y DD., Los hongos que tuvieron mayor resistencia al Cr(VI) fueron B, P y J así mismo los más resistentes a Ni(II) resultaron ser A, M, B y P.

TABLA XI. CRECIMIENTO DE LEVADURAS EN MEDIOS CON PLOMO (II), CROMO (VI), CADMIO (II), COBRE (II), ZINC (II) Y NÍQUEL (II).

Levadura	Fuente de aislamiento	Concentración mgL^{-1}	Cr (VI)	Cu (II)	Cd (II)	Zn (II)	Ni (II)	Pb (II)
L1	SRP	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
		200	++	+++	++	+++	+++	+++
		400	++	+++	++	+++	+++	+++
		600	++	++	++	++	++	++
		800	-	+	+	++	-	++
		1000	-	-	-	+	-	+
		1100	-	-	-	-	-	-
L2	AI	200	++	+++	++	+++	+	+++
		400	-	+++	+	+	-	+++
		600	-	+	-	-	-	+++
		800	-	-	-	-	-	++
		1000	-	-	-	-	-	+
		1100	-	-	-	-	-	-

Nota: De tres réplicas de cada experimento se calcularon las medias y se utilizó el siguiente criterio:

(++++) Muy abundante turbidez, 3.7×10^7 UFC/mL

(+++) Abundante turbidez, 4.4×10^6 - 6.8×10^6 UFC/mL

(++) Regular turbidez, 4.3×10^5 - 1.6×10^6 UFC/mL

(+) Escasa turbidez $>1.5 \times 10^6$ - UFC/mL

(-) No hubo crecimiento

La levadura L1 aislada de sedimento de río Pesquería, mostró mayor resistencia que la L2, ya que fue capaz de crecer en concentraciones superiores a 600 mgL^{-1} de cada uno de los seis metales probados como se muestran en la tabla XI.

En suma cuatro bacterias, siete hongos filamentosos y una levadura presentaron resistencia multimetálica con CMI de plomo (II), cromo (VI), cadmio (II), cobre (II), zinc (II) y níquel (II) superiores a 500 mgL^{-1} .

En la tabla I presentada en el capítulo 2 se muestra, los resultados de la literatura consultada sobre Concentración Mínima Inhibitoria de metales pesados sobre el crecimiento de diferentes microorganismos. Se observa que la mayoría de los datos son el resultado de experimentos realizados por el método de difusión en agar. Sin embargo, este método presenta desventajas ya que el ion metálico puede unirse a los componentes del medio, entre un 75 y un 98% dependiendo del pH y de la cantidad de metal adicionada, lo que trae como consecuencia que la concentración del metal disponible al microorganismo es inferior a la concentración adicionada al medio (Gómez *et al*, 1999). Aun así los resultados obtenidos en este estudio para el caso de hongos, superan de dos a siete veces a la CMI informada en la literatura.

Lo anterior destaca la importancia de este trabajo ya que los microorganismos aislados son fuente potencial de investigación en el campo de la ecología y de la biorremediación.

4.3 Identificación de los aislados con resistencia multimetálica

4.3.1 Bacterias

Los aislados bacterianos resistentes a los seis metales en estudio fueron clasificados como a c, d, f, k, o, q, t y w. Las características morfológicas y perfil bioquímico de las bacterias aisladas así como su ubicación taxonómica se presentan en la tabla XII.

TABLA XII RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOCULTURALES, PERFIL BIOQUÍMICO Y UBICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS AISLADOS BACTERIANOS RESISTENTES A PLOMO(II), CROMO (VI), CADMIO (II), COBRE (II), ZINC (II) Y NÍQUEL

Aislado	Características morfológicas	Perfil Bioquímico	Ubicación taxonómica
a y f	Bacilos grandes, Gram positivos. Las células individuales mostraron extremos cuadrados o cóncavos y se observaron endosporas subterminales. Las colonias mostraron coloración crema grisácea con bordes ondulados.	Catalasa (+) Motilidad (+) Oxidasa (+) Hemólisis (+) Glucosa (+) Maltosa (+) Salicina (+) Manitol (-) Indol (-) VP (+) TSI V/A Urea (-)	<i>Bacillus cereus</i> (Figura 5)
c	Bacilos Gram negativos. Las colonias muestran una pigmentación amarilla pálida. Los bacilos son rectos o levemente curvos.	Oxidasa (+) Motilidad (+) Manitol (+) Sacarosa (-) Glucosa (+) Indol (-) H ₂ S (-) Citrato (+) Urea (-) No fermentadores crecieron en agar sangre y agar de MacConkey, son móviles y citocromooxidasa-positivo y aerobios estrictos.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Figura 6)

TABLA XII RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOCULTURALES, PERFIL BIOQUÍMICO Y UBICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS AISLADOS BACTERIANOS RESISTENTES A PLOMO(II), CROMO (VI), CADMIO (II), COBRE (II), ZINC (II) Y NÍQUEL (continuación)

Aislado	Características morfoculturales	Perfil Bioquímico	Ubicación taxonómica
q	Bacilos Gram negativos. Los bacilos son rectos o levemente curvos. La cepa no presentó pigmentación. El medio que se utilizó fue el medio de agar BHI	Oxidasa (+) Motilidad (+) Manitol (+) Sacarosa (-) Glucosa (+) Indol (-) H ₂ S (-) Citrato (+) Urea (-) No fermentadores crecieron en agar sangre y agar de MacConkey, son móviles y citocromooxidasa- positivo y aerobios estrictos.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Figura 6)
k, o y t	Bacilos móviles Gram positivos esporulados, las esporas están de manera central o para central. Colonias grandes de forma oval o redondas con bordes enteros y de apariencia de vidrio despulido que después se torno opaca.	Catalasa (+) Motilidad (+) Oxidasa (+) Hemólisis (+) Glucosa (-) Maltosa (V) Salicina (-) Manitol (-) Urea (-) Indol (V) VP (-) TSI Alk/A	<i>Bacillus brevis</i> (Figura 7)
w	Cocos aerobios estrictos, Gram positivos agrupados en racimos. Colonia opacas y de consistencia cremosa de color amarillo pálido.	Hemólisis (reacción débil) Glucosa (-) Sacarosa (+) Maltosa (-) Catalasa (+) Oxidasa (-) Coagulasa (-) Indol (-) Manitol (-) Urea (-) Movilidad (-)	<i>Staphylococcus simulans</i> (Figura 8)

TABLA XII. RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOCULTURALES, PERFIL BIOQUÍMICO Y UBICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS AISLADOS BACTERIANOS RESISTENTES A PLOMO(II), CROMO (VI), CADMIO (II), COBRE (II), ZINC (II) Y NÍQUEL (continuación)

d	Bacilos o cocobacilos gram negativos. Células aisladas y a veces dispuestas en parejas. Colonias pequeñas y redondas	Oxidasa (-) Motilidad (-) Sacarosa (-) Glucosa (+) Indol (-) H ₂ S (-) Citrato (+) Urea (-)	<i>Acinetobacter anitratus</i> (Figura 9)
h	Bacilos noformadores de esporas, Gram positivos ligeramente curvados. Colonias pequeñas, redondas de color gris-blancas.	Catalasa (+)	<i>Corynebacterium jeikeium</i> (Figura 10)

V= Variable, A= ácido, Alk= alcalino.

La características morfoecultuales de las bacterias Gram positivas areobias permitieron determinar el género *Staphylococcus* (cepa w) y la presencia de bacilos Gram positivos de las cepas a,f,k,o,t y h. La prueba de catalasa y la morfología microscópica permitieron distinguir micrococos y estreptococos. Además la utilización de manitol y prueba de coagulasa negativas diferenciaron a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus siumulans*.

Para diferenciar los géneros de los bacilos Gram positivos se realizaron observaciones de presencia de esporas, y las pruebas de motilidad, producción de catalasa y oxidasa. De acuerdo a lo anterior las cepas metalorresistentes formadoras de esporas correspondieron al género *Bacillus* (cepas a,f,k,o,t) y las formadoras gránulos metacromáticos al género *Corynebacterium* (cepa h).

Identificación de Bacterias

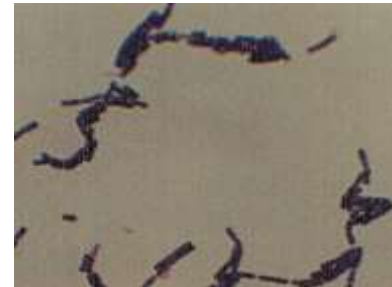
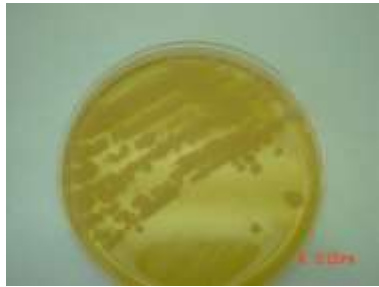


Fig. 5 Características macroscópicas y microscópicas de *Bacillus cereus*.

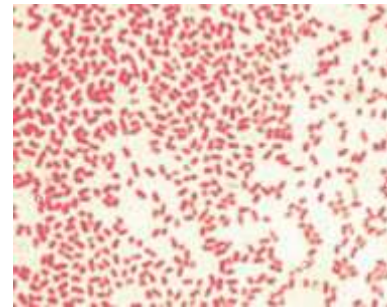
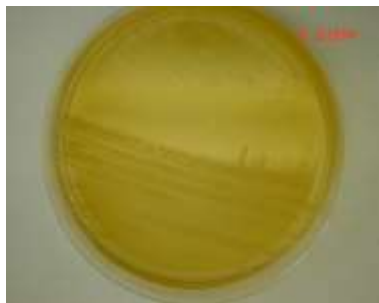


Fig. 6 Características macroscópicas y microscópicas de *Pseudomonas*.



Fig. 7 Características macroscópicas y microscópicas de *Bacillus brevis*.

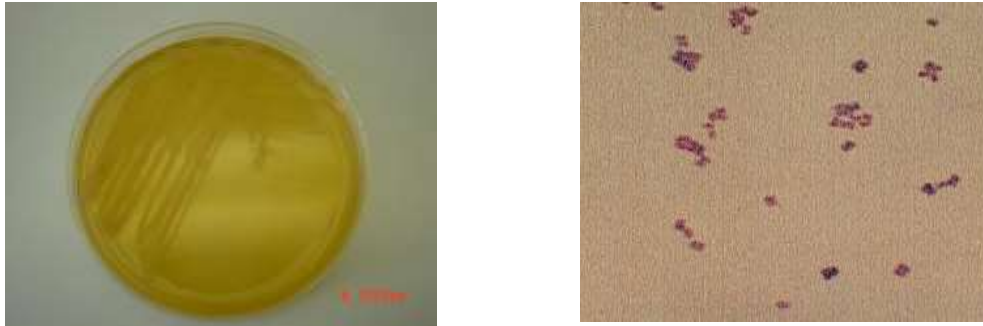


Fig. 8 Características macroscópicas y microscópicas de *Staphylococcus simulans*.

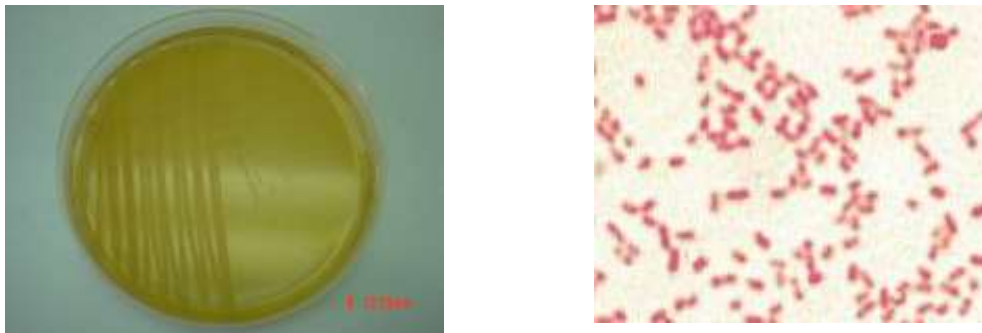


Fig. 9 Características macroscópicas y microscópicas de *Acinetobacter anitratus*.

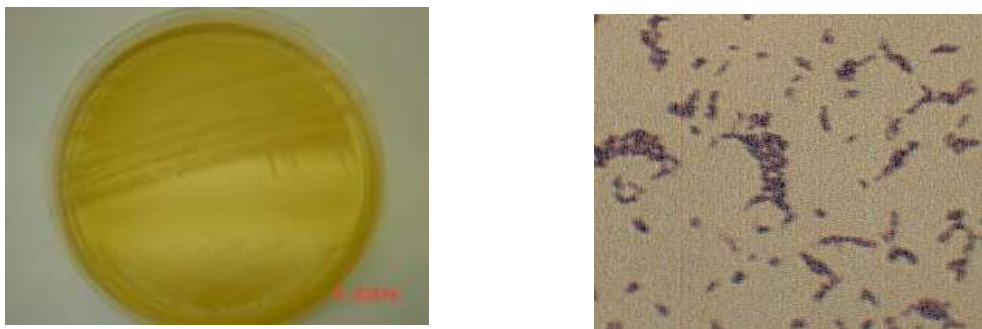


Fig. 10 Características macroscópicas y microscópicas de *Corynebacterium jeikeium*

Las especies del género *Bacillus* fueron determinadas mediante pruebas bioquímicas adicionales como utilización de manitol, citratos y Voges-Proskauer. La primera fue negativa con lo que se descartaron *B. subtilis* y *B. licheniformis*. La segunda fue positiva lo que permitió descartar la presencia de *B. lentus* el cual presenta esta prueba negativa. La prueba de Voges-Proskauer fue contundente para diferenciar las especies de *B. cereus* (cepas a, f) de *B. brevis* (cepas k,o,t).

La especie de *B. polymyxa* se descarto desde el inicio de las pruebas ya que esta cepa desprende un olor característico a manzana.

La bacteria h la cual presentó las siguientes características microscópicas: bacilos Gram positivos ligeramente curvados con gránulos metacromáticos, no móvil, catalasa y oxidasa positivas por características microscópicas y morfoculturales se determinó que pertenece al género *Corynebacterium*. Para la identificación de la especie se corrieron algunas pruebas bioquímicas como ureasa, manosa y esculina. Para la cepa aislada la reacción negativa de la manosa la separa de la mayoría de las especies de *Corynebacterium* como: *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis*, *C. xerosis*, *C. kutscheri*, *C. striatum* y *C. flavescentis*. Las especies de *C. pseudodiphtheriticum* y *C. paurometabolum* las cuales muestran el perfil bioquímico similar se descartan con la prueba de ureasa (+) y esculina (+) respectivamente y para la cepa aislada son negativas por lo que el microorganismo fue identificado como *Corynebacterium jeikeium*.

Se obtuvieron tres aislados gram negativos areobios con multirresistencia sobresaliente (c, q y d). Las pruebas que se corrieron para diferenciar los géneros de las bacterias gram negativas fueron las pruebas de oxidasa, fermentación de lactosa y motilidad. Las cepas c y q fueron bacilos cortos y rectos. Sus colonias presentaron pigmentación. Además mostraron las pruebas de oxidasa y motilidad positivas mientras que la fermentación de lactosa fue negativa. Estas características ubicaron a las cepas c y q en el género *Pseudomonas*.

Las pruebas contundentes para diferenciar las especies del género *Pseudomonas* fueron las siguientes: utilización de glucosa y manosa así como la prueba de oxidasa, las cuales en la cepa c fueron (+), (-) y (+) respectivamente y para la cepa q (+), (+) y (+). *P. alcaligenes* y *P. pseudoalcaligenes* se descartaron ya que no utilizan la glucosa. Por otro lado *P. syringae* y *P. viridiflava* dan la prueba de oxidasa negativa, lo que las elimina también. Lo anterior señala a la cepa c como *P. aeruginosa* manosa (-) y a la cepa q como *P. fluorescens* manosa (+).

La cepa d presentó morfología coco bacilar Gram negativo y colonias no pigmentadas. Las pruebas de motilidad, oxidasa y fermentación de lactosa dieron reacción negativa, colocando a esta cepa en el género *Acinetobacter*. Existen dos especies del género *Acinetobacter* que se diferenciaron con la prueba de glucosa la cual para la cepa d dio positiva. Estas características

corresponden a *A. anitratus*. La ubicación taxonómica de los aislados fue confirmada por el método API 20E Tabla XIII y BBL CRYSTAL Tabla XIV.

TABLA XIII. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS BACTERIANOS RESISTENTES A PLOMO(II), CROMO (VI), CADMIO (II), COBRE (II), ZINC (II) Y NÍQUEL (II), UTILIZANDO EL MÉTODO API 20E

Pruebas	Substratos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Acinetobacter anitratus</i>
ONPG	*	-	-	-
ADH	Arginina	-	+	-
LDC	Lisisna	-	-	-
ODC	Ornitina	-	-	-
[CIT]	Citrato sódico	+	+	+
H ₂ S	Tiosulfato sódico	-	-	-
URE	Urea	-	-	-
TDA	Triptofano	-	-	-
IND	Triptofano	-	-	-
[VP]	Creatinina piruvato sódico	-	-	-
[GEL]	Gelatina Kohn	-	-	-
GUL	Glucose	+	+	+
MAN	Manitol	-	-	-
INO	Inositol	-	-	-
SOR	Sorbitol	-	-	-
RHA	Ramnosa	-	-	-
SAC	Sacarosa	-	-	-
MEL	Melibiosa	+	+	+
AMY	Amigdalina	-	-	-
ARA	Arabinosa	-	-	-
MNS	Manosa	-	+	-
OX	**	+	+	-

* ONPG= orto-nitro-fenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) isopropil-tiogalactopiranosido (IPTG).

OX=, **OX= N,N,N,N-tetrametil-1,4-fenilenediamina.

TABLA XIV. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS BACTERIANOS RESISTENTES A PLOMO (II), CROMO (VI), CADMIO (II), COBRE (II), ZINC (II) Y NÍQUEL (II), UTILIZANDO EL MÉTODOS BBL CRISTAL.

Código	Característica de la prueba	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus brevis</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>
FCT	Control fluorescente negativo	-	-	-
FGC	4 MU- β -D-glucósido	-	-	-
FPR	Prolina-AMC	-	+	+
FAR	Arginina-AMC	+	+	+
FME	Metionina-AMC	+	+	-
FCE	4 MU- β -D-celobiósido	-	-	-
FHO	4 MU-fosfato	-	+	-
FPY	L-ácido piroglutámico-AMC	+	+	+
FTR	Triptófano-AMC	+	+	-
FVA	L-valina-AMC	-	+	+
FPH	L-fenilamina-AMC	+	+	+
FGS	4 MU- α -D-glucósido	-	+	-
ARA	Arabinosa	-	-	-
MAL	Maltosa	+	-	-
DXT	Dextrina	+	-	-
MNT	Manitol	-	-	-
GAL	Galactosa	-	-	-
AGN	N-acetil-D-glucosamina	+	-	-
TRE	Trehalosa	+	-	-
MNS	Manosa	-	-	-
MTT	Maltotriosa	-	-	-
POG	*	+	-	-
AGL	p-nitrofenil- α -D-glucósido	+	+	-
PCE	p-nitrofenil- β -D-celobiósido	-	-	-
BGL	p-nitrofenil- β -D-glucósido	-	-	-
PHO	p-nitrofenil-fosfato	+	+	-
PPG	p-nitrofenil- α -D-galactósido	+	-	+
URE	Urea	-	-	+
ESC	Esculina	-	-	-
ORN	Ornitina	-	+	-

*POG= o-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG) y p-nitrofenil- β -D-glucósido

TABLA XIV. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS BACTERIANOS RESISTENTES A PLOMO (II), CROMO (VI), CADMIO (II), COBRE (II), ZINC (II) Y NÍQUEL (II), UTILIZANDO EL MÉTODOS BBL CRISTAL. (Continuación)

Código	Característica de la prueba	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus brevis</i>	<i>Corynebacterium jeikeium</i>
FCT	Control fluorescente negativo	-	-	-
FGC	4 MU- β -D-glucósido	-	+	-
FPR	Prolina-AMC	-	+	-
FAR	Arginina-AMC	+	+	-
FME	Metionina-AMC	+	+	-
FCE	4 MU- β -D-celobiósido	+	-	-
FHO	4 MU-fosfato	+	+	-
FPY	L-ácido piroglutámico-AMC	-	-	+
FTR	Triptófano-AMC	-	+	-
FVA	L-valina-AMC	+	-	-
FPH	L-fenilalanina-AMC	+	+	-
FGS	4 MU- α -D-glucósido	+	+	-
ARA	Arabinosa	-	-	-
MAL	Maltosa	+	-	-
DXT	Dextrina	+	-	-
MNT	Manitol	-	-	-
GAL	Galactosa	-	-	-
AGN	N-acetil-D-glucosamina	+	-	-
TRE	Trehalosa	+	-	-
MNS	Manosa	-	-	-
MTT	Maltotriosa	+	-	-
POG	*	+	-	-
AGL	p-nitrofenil- α -D-glucósido	+	+	-
PCE	p-nitrofenil- β -D-celobiósido	-	-	-
BGL	p-nitrofenil- β -D-glucósido	-	-	-
PHO	p-nitrofenil-fosfato	-	+	+
PPG	p-nitrofenil- α -D-galactósido	-	-	-
URE	Urea	-	-	-
ESC	Esculina	-	-	-
ORN	Ornitina	-	+	+

*POG= o-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG) y p-nitrofenil- β -D-glucósido

Entre las bacterias se aislaron siete Gram positivas, una de morfología cocoide y seis de forma bacilar. De éstas, cinco presentaron esporas ovales y subterminales y algunas fueron capsuladas. Los perfiles bioquímicos utilizando el sistema tradicional y el API 20 E permitieron la taxonómica de las bacterias Gram negativas. La cepa “c” como ubicación taxonómica *Pseudomonas aeruginosa* (Código 0200044), a la cepa “q” como *Pseudomonas fluorescences* (código 2200044), y la cepa “d” como *Acinetobacter anitratus* (código 0204040).

Con el sistema BBL-CRYSTAL (tabla XIV) se identificó a la cepa “w”, como *Staphylococcus simulans* (código 1422000010) a la “h” como *Corynebacterium jeikeium* (0020000021), a las cepas “a” y “f” como *Bacillus cereus* (códigos 07473156001 y 0632314630) y a las cepas “k”, “o” y “t” como *Bacillus brevis* (Códigos 3653000221, 1677000221 y 1223000221).

De los aislados bacterianos tolerantes a plomo(II), cromo(II), cadmio(II), cobre(II), zinc(II) y níquel(II)), se encontró un 70% de bacterias Gram positivas, entre las que predominó el género *Bacillus*, un 30% bacterias Gram negativas. El 50% de las Gram positivas resultaron ser bacterias esporuladas. La incidencia de las bacterias referidas indica la influencia de la estructura y composición de la pared celular, así como la propiedad de formación de esporas sobre la capacidad de adaptación y supervivencia de las bacterias en ambientes contaminados con metales pesados.

La frecuencia de aislamiento de bacterias esporuladas de los ecosistemas estudiados corroboran los resultados de González (2000) quien aisló bacterias resistentes a plomo de muestras contaminadas con metales pesados y todos los aislados fueron bacilos Gram positivos. También coincide con Gómez *et al*, (2002) quienes encontraron mayor frecuencia de aislamientos de bacterias Gram positivas esporuladas en suelo.

La pared celular de las bacterias Gram positivas enlazan diez veces más cationes metálicos que las bacterias Gram negativas (Beveridge y Fyfe, 1985). Esto puede ser atribuido en parte al grosor de la capa de peptidoglucano (Langley y Beveridge, 1999) y a la presencia de los grupos fosfato de los ácidos teicóicos que poseen estas bacterias en su pared celular. Además Lee y Tebo, (1998) sugieren que el área y la carga superficial así como la abundancia de grupos carboxilo y fosfato en la pared celular de cepas de *Bacillus* son responsables de su alta capacidad de enlazar metales. Sin embargo, Beveridge y Doyle (1989) y Gómez *et al*, (1999) informaron que las bacterias Gram negativas son más resistentes a los metales pesados que las Gram positivas. En estas bacterias se han encontrado varios mecanismos de resistencia a metales determinados por plásmidos o por genes cromosómicos (Mergeay *et al.*, 1985; Schmitd y Schlegel, 1994; Nies, 1999; Marrero *et al*, 2004).

El carácter de resistencia a metales depende de factores genéticos y estos factores indiscutiblemente influyen sobre la fisiología y estructura de los

microorganismos y pueden ser aprovechados para procesos de biorremediación ya que estos microorganismos poseen propiedades de bioadsorción, bioacumulación o biotransformación de metales.

4.3.2 Hongos filamentosos

Las características morfoculturales y la ubicación taxonómica de los aislados fúngicos que presentaron resistencia multimetálica se muestra en la tabla 16.

A partir de estos resultados se ubicaron las diferentes cepas en los géneros *Acremonium* (B), *Alternaria* (E), *Aspergillus* (H), *Fusarium* (J,V,Z) *Paecilomyces* (M,AA), *Trichoderma* P) , *Penicillium* (X,DD) y *Rhizopus* (Y).

EL aislado B se caracterizó por formar conidios en cúmulos, conidióforos largos y muy delicados que sirven de apoyo a los grupos de conidios alongados y su disposición simulando la superficie cortical del cerebro lo que conllevó a ubicarlo en el género *Acremonium*. Los conidios son no septados y ligeramente curvados por lo que se ubicó como *Acremonium falciforme*. (Larone, 1995).

El aislado E presentó macroconidio ligeramente triangulares, color marrón, con tabiques transversales, colocados en cadenas sencillas o ramificadas, lo que situó a este hongo en el género *Alternaria*. Adicionalmente presentó colonias de coloración gris en diferentes tonalidades, desde gris verdoso en el

centro hasta gris oscuro en el extremo de la colonia, colocando al aislado H en la especie *Alternaria alternata*. (Atlas Ronal y Bartha, 1995).

El aislado H al ser observado al microscopio mostró conidioforos largos que terminaban en una vesícula globosa rodeada de esterigmas con cadenas de colidios lo que lo ubicó en el género *Aspergillus*. También formó colonias inicialmente con un micelio aéreo blanco, veloso, que posteriormente se cubrió de esporas de color negro, el reverso de la colonia presentó con un color amarillo pálido. El conjunto de características morfológicas, permitieron colocar al aislado H como *Aspergillus niger*. (Atlas Ronal y Bartha, 1995).

La presencia de hifas septadas y macroconidios multicelulares en forma de hoz, de banana o puntiagudos en los aislados J,V,Z, los colocaron en el género *Fusarium*. Además la formación de colonias cubiertas de micelio aéreo inicialmente blanco que al madurar se torna color rosa a violeta ubicaron a este hongo como *Fusarium oxysporium*. (De Hoog *et al.*, 2000).

Los aislados M y AA se caracterizaron por presentar conidióforos pequeños, ramificados con fialides y cadenas largas de conidios, lo que lo ubicó en el género *Paecilomyces*. Así mismo presentó colonias blancas que posteriormente tornaron coloración rosa pálido coloración que posteriormente también apareció con mayor intensidad en el anverso de la colonia. Estas características permitieron ubicar a estos aislados como *Paecilomyces lilacinus*. (Larone, 1995).

El aislado P presentó hifas ramificadas con conidios pequeños, esféricos, de colores verdes y agrupados en racimos por lo que se ubicó en el género *Trichoderma*. También formó colonias blancas jaspeadas con esporas verdes y por el reverso coloreadas de amarillo. Las características morfoculturales del aislado P y su facilidad para crecer a 45⁰C, lo situaron como *Trichoderma viride*. (De Hoog *et al.*, 2000).

TABLA XV. RESUMEN DE LAS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS MORFOCULTURALES, Y UBICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS AISLADOS FÚNGICOS RESISTENTES A PLOMO (II), CROMO (VI), CADMIO (II), COBRE (II), ZINC (II) Y NÍQUEL (II)

Aislado	Características microscópicas	Características culturales		Ubicación Taxonómica
		Frente	Reverso	
B	Hifas delgadas, hialinas y tabicadas. Conidiofóros largos y delgados, conidos ligeramente curvos no septados, forman agrupaciones.	Micelio aéreo algodonoso, color amarillo-naranja.	Coloración naranja fuerte a amarillo sin rugosidades,	<i>Acremonium falciforme</i> (Figura 11, 12)
E	Hifas septadas, macroconidio color marrón, con tabiques transversales y longitudinales formando cadenas largas.	Micelio aéreo desarrollado, algodonoso, colonia color gris olivo a negro.	Coloración negra de apariencia lisa	<i>Alternaria alternata</i> . (Figuras 13 y14)
H	Hifas hialinas y tabicadas. Conidiofóros largos con vesículas. Conidios esféricos agrupados en cadenas.	Micelio aéreo, claro con esporas café obscuro	Coloración amarillo pálido.	<i>Aspergillus niger</i> (Figuras 15 y16)
J,V,R	Hifa hialinas y tabicadas. Macroconidios en forma de banana	Micelio aéreo veloso, color blanco que después cambia a rosa violeta,	Rosa violeta	<i>Fusarium oxysporium</i> (Figuras 17 y18)
M, AA	Hifas hialinas y tabicadas. Conidios ovales formando cadenas largas	Micelio corto, de apariencia aterciopelad a color crema rosado.	Coloración crema y luego lila Apariencia lisa	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Figuras 19 y20)
P	Hifas hialinas, relativamente anchas tabicadas con paredes paralelas. Conidiofóros cortos y ramificados. Conidos esféricos formando acumulaciones o racimos.	Micelio blanco corto formando un césped que cubre toda la caja de Petri. Coloración verde y fondo blanco.	Coloración amarilla sin rugosidades	<i>Trichoderma viride</i> . (Figuras 21 y 22)

Aislado	Características microscópicas	Características culturales		Ubicación Taxonómica
		Frente	Reverso	
X,DD	Hifas hialinas y tabicadas. Conidióforos que forman un cepillo con conidios son esféricos formando cadenas largas.	Micelio aéreo colonias color verde azulado, con rugosidades	Color crema a amarillo con marcados pliegues	<i>Penicillium chrysogenum</i> (Figuras 23 y 24)
Y	Hifas hialinas. Esporas ovales de color negro dentro de un esporangio. Rizoides adyacentes a los esporangióforos.	Micelio aéreo, veloso abundante, colonias de color blanco grisáceo	Color crema de apariencia lisa.	<i>Rhizopus arrizus</i> . (Figuras 25 y 26)

Los aislados M, AA, se caracterizaron por la presencia de hifas septadas, conidióforos con esterigmas múltiples (poliverticilados) y cadenas de conidios esféricos. Estas características lo colocaron en el género *Penicillium*. Ambos aislados presentaron colonias con ligeros pliegues, de aspecto algodonoso color blanco en su estadio joven y verde azulado en su estadio maduro. El anverso de la colonia mostró color amarillo pálido. La morfología microscópica y macroscópica correspondieron al hongo *Penicillium chrysogenum*. (De Hoog *et al.*, 2000)

Finalmente el aislado Y mostró hifas delgadas no septadas, esporangióforos largos ramificados con rizoides adyacentes y estolones, así como con apófisis pequeña, columela ligeramente alargada y esporangio globoso de color café con esporangiosporas esféricas negras. Lo anterior ubicó al aislado Y en el género *Rhizopus*. Además presentó colonias algodonosas con micelio aéreo abundante de color blanco que al cubrirse de esporas se tornaron de color gris.

Presentó buen crecimiento a 40⁰C. Lo anterior situó al este aislado como *Rhizopus arrhizus*. (De Hoog *et al.*, 2000).

Once de las cepas fúngicas obtenidas que presentaron alta resistencia multimetálica, pertenecen a la clase *Ascomycetes* y solo una a la clase *Zigomycetes*.

4.3.2.1 Identificación de Hongos



Fig. 11 Superficie y reverso de *Acremonium falciforme*.

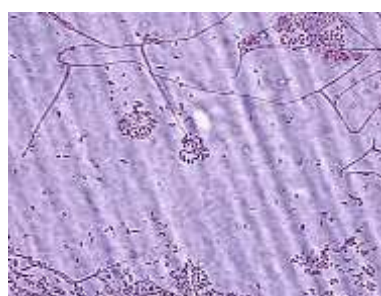


Fig. 12 Características microscópicas de *Acremonium falciforme*.



Fig. 13 Superficie y reverso de *Alternaria alternata*.



Fig. 14 Características microscópicas de *Alternaria alternata*.

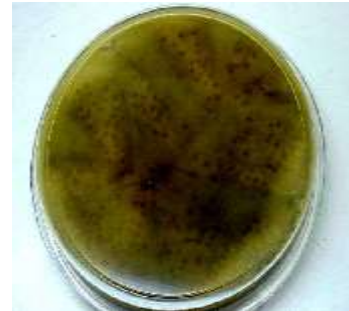


Fig. 15 Superficie y reverso de *Aspergillus niger*.

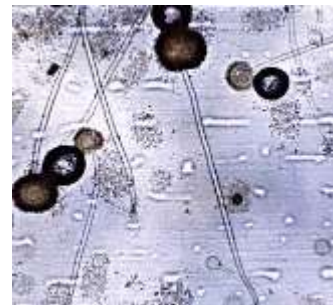


Fig. 16 Características microscópicas de *Aspergillus niger*.



Fig. 17 Superficie y reverso de *Fusarium oxysporium*.

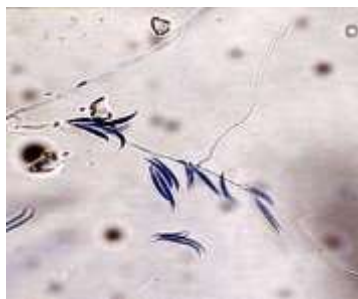


Fig. 18 Características microscópicas de *Fusarium oxysporium*.

Dentro de los ascomicetos se encontraron tres géneros (*Acremonium*, *Fusarium* y *Trichoderma*) que corresponden al orden *Hypocreales*, otros tres géneros (*Aspergillus*, *Paecilomyces* y *Penicillium*) que forman parte del orden *Eutiorales* y solo uno (*Alternaria*) que pertenece al orden *Pleosporales*. El zigomiceto aislado fue *Rhizopus* y es miembro del orden *Mucorales*. Los resultados muestran una predominancia de los hongos ascomicetos, entre ellos prevalecieron los géneros *Fusarium* (tres aislados) *Paecilomyces* (dos aislados) y *Penicillium* (dos aislados).



Fig. 19 Superficie y reverso de *Paecilomyces lilacinus*.



Fig. 20 Características microscópicas de *Paecilomyces lilacinus* .



Fig. 21 Frente y reverso de *Trichoderma viride*.

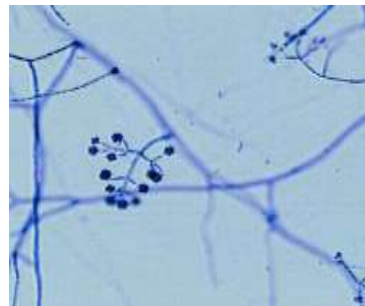


Fig. 22 Características microscópicas de *Trichoderma viride*.

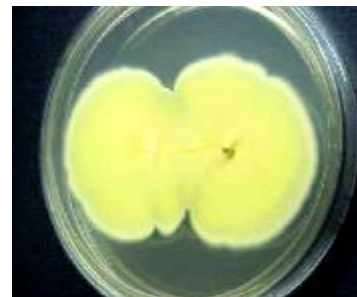


Fig. 23 Superficie y reverso de *Penicillium chrysogenum*.



Fig. 24 Características microscópicas de *Penicillium chrysogenum*.



Fig. 25 Superficie y reverso de *Rhizopus arrizus*.

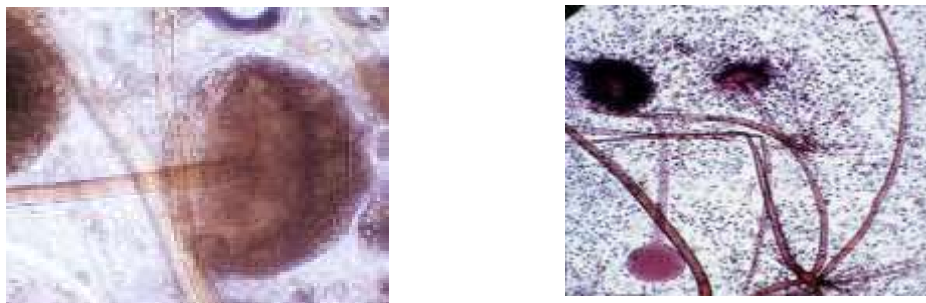


Fig. 26 Características microscópicas de *Rhizopus arrizus* .

Los hongos, tanto unicelulares como filamentosos, adquieren resistencia a ambientes saturados de metales pesados como: cobre, zinc, manganeso, níquel y cobalto y son capaces de acumular metales tóxicos tales como cadmio, mercurio, plomo, uranio, plata y oro en cantidades substanciales (McAfee *et al*, 2001).

La resistencia de los hongos filamentosos a los metales puede ser debida a diversos mecanismos que incluyen: el atrapamiento del metal por los componentes de la pared celular, la quelatación extracelular o precipitación extracelular, la complejación intracelular en el citosol mediante ligandos como con metalotioneínas (Cervantes y Gutierrez, 1994) o glutathione (Bellion et al, 2006), la reducción química o mediante bombas de expulsión membranal (Hall, 2002). La estructura y los componentes de la pared celular de los hongos juegan un papel crucial en su resistencia metálica. En la mayoría de los hongos filamentosos es un sistema de dos fases: una capa interna de microfibrillas tejidas, usualmente embebidas en una fase amorfa más exterior consistente de una capa de proteínas adyacente a ellas, luego una capa de glucoproteínas y finalmente en la parte externa una capa de beta-1,3 y 1,6-glucanas y quitina. Otros polisacáridos encontrados en la pared celular de los hongos son: celulosa, α y β glucano, manano, poliuronidos y los heteropolisacáridos: polularia (polímero de L-Fructosa, D-Manosa, D-Galactosa, Ácido D-Glucónico) y mucorano (polímero de D-Glucosa, Ácido D-Glucónico, D-Galactosa, D-Manosa) (Volesky, 1995). Esta compleja estructura es modificada en presencia de los metales impidiendo la acumulación intracelular de éstos y favoreciendo la detoxificación. (Wase y Forster, 1997)

4.3.3 Levaduras

Los dos aislados de levaduras fueron resistentes a los seis metales en estudio, los cuales fueron clasificados como L1 y L2 sus características morfológicas y bioquímicas se muestran en la tabla XVI.

La levadura L1 presentó colonias de consistencia densa y pigmentación rosada intensa, al microscopio no se observó pseudomicelio y las células fueron ovales. Estas características permitieron ubicarla en el género *Rhodotorula* (Barnett *et al.*, 2000). Las pruebas de fermentación de glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, así como, la asimilación de inositol, D-manitol, glicerol, D-glucitol y la reducción de nitratos resultaron negativas. Fue capaz de asimilar maltosa, glucosa y sacarosa y de realizar la hidrólisis de urea (Tabla 16). Por otro lado las respuestas a las pruebas bioquímicas de incapacidad para asimilar el inositol y la lactosa, permitieron ubicarla como *Rhodotorula rubra*.

El aislado L2 presentó la morfología característica del género *Saccharomyces*. Para diferenciar las especies de este género se aplicaron las pruebas de fermentación y asimilación glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa y fructosa, resultando todas positivas excepto la de lactosa. Los resultados de la morfología y perfil bioquímico situaron al aislado L2 como *Saccharomyces cerevisiae*. El resumen de las características de las levaduras aisladas se refieren en la tabla XVI.

Rhodotorula rubra fue aislada de sedimento de río Pesquería y pertenece a la clase *Basidiomycetes*, orden *sporidiales* mientras que *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvo de agua industrial y pertenece a la clase *Ascomycetes*, orden *Saccharomycetales*. Ambas levaduras han sido reportadas como muy abundantes en la naturaleza.

TABLA XVI. CARACTERÍSTICAS MORFOCULTURALES Y UBICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS AISLADOS DE LEVADURAS RESISTENTES A PLOMO(II), CROMO (VI), CADMIO (II), COBRE (II), ZINC (II) Y NÍQUEL (II)

Aislado	Características morfoeculturales	Perfil Bioquímico		Ubicación taxonómica
L1	Células ovals, sin formación de pseudohifas, colonias de consistencia densa y pigmentación rosada intensa,	Fermentación de carbohidratos	Arabinosa (+)	<i>Rhodotorula rubra</i> (Figura 26)
			Manosa (-)	
			Melibiosa (-)	
			Ramnosa (-)	
			Maltosa (-)	
			Galactosa (-)	
			Trehalosa (-)	
			Esculina (-)	
		Asimilación de carbohidratos	Inositol (-)	
			Glicerol (-)	
			D-Manitol (-)	
			D-Glucitol (-)	
			Glucosa (+)	
			Maltosa (+)	
			Sacarosa (+)	
		Ureasa (+)		
		Reducción de nitratos (-)		
L2	Células de redondas a ovals, colonias blancas, birllantes, redondas, de consistencia húmeda y cremosa, con el centro elevado y los bordes ligeramente irregulares	Fermentación de Carbohidratos	Glucosa (+)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Figura 27)
			Maltosa (+)	
			Galactosa (+)	
			Sucrosa (+)	
			Lactosa (-)	
			Fructosa (+)	
		Asimilación de carbohidratos	Glucosa (+)	
			Maltosa (+)	
			Galactosa (+)	
			Lactosa (-)	
			Sacarosa (+)	
		Resistencia a la actidiona	(-)	

Las levaduras deben su metalorresistencia a diferentes elementos genéticos así como a la composición de su pared celular. Esta estructura es fina cuando las células son jóvenes y se engruesa con la edad. Sus constituyentes principales son dos polisacáridos, proteínas y lípidos. Estos componentes aportan grupos funcionales polifosfatos, carboxilos, tioles y aminos que se combinan con los metales evitando que penetren al citoplasma celular y dañen a la célula. (Volesky, 1999).

4.3.3.1 Identificación de levaduras



Fig. 27 Características macroscópicas y microscópicas de *Rhodotorula rubra* .



Fig. 28. Características macroscópicas y microscópicas de *S. cerevisiae*

La presencia de pigmentos característicos en *Rhodotorula rubra* protege a la levadura del efecto tóxico de los metales ya que éstos se pueden unir covalentemente al pigmento y evitar que el metal penetre a la célula.

Otro mecanismo de resistencia utilizado por las levaduras es la bioacumulación, en el cual el metal es transportado a través de la membrana y una vez en el citoplasma éste es acomplejado por proteínas ricas en grupos sulfhidrilo. (Lovely, 2000).

Se ha demostrado que en algunas levaduras resistentes a cadmio o mercurio producen el gen inducible YCF1 como un mecanismo de protección al efecto tóxico de estos metales (Szczyпка, *et al.*, 1994). Tanto el mercurio como el cadmio son secuestrados por proteínas S-glutation (Ycf1p) y concentrados en las vacuolas de la levadura. (Gueldry *et al.*, 2003).

De todas las muestras procesadas se aislaron microorganismos con elevadas CMI excepto del SRSJ. Del agua de desecho industrial fue de donde se aislaron microorganismos con los mayores valores de CMI (Tabla XVII), lo que puede deberse a la elevada contaminación con metales pesados (especialmente cromo(VI) y plomo(II)) de esta muestra, así como las condiciones en que se mantiene el efluente antes de ser descargado a los ríos que permite que los microorganismos tengan un contacto prolongado y continuo con los metales y favorece la formación de consorcios microbianos y biopelículas. (Tietzel y Parsec, 2003).

TABLA XVII. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE PLOMO(II),CROMO (VI), CADMIO(II), COBRE(II), ZINC(II) Y NÍQUEL(II) DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS Y HONGOS Y SUS FUENTES DE AISLAMIENTO.

		CMI (mgL ⁻¹)					
Fuente de aislamiento	Microorganismo	Cr(VI)	Cu(II)	Cd(II)	Zn(II)	Ni(II)	Pb(II)
T	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	>800	>3200	>2000	>3600	>3200	>3600
	<i>Aspergillus niger</i>	>1000	>1200	>800	>1200	>1000	>1200
	<i>Fusarium oxysporium</i>	>1000	>1200	>800	>1200	>1000	>1200
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	>800	>1800	>1400	>2000	>1800	<2000
	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	>800	>1600	>800	>1600	>1400	1400
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	>1400	>800	>1400	>1800	>1400	>1800
AI	<i>Acremonium falciforme</i>	>3400	>2800	>2400	>3700	>2800	>3700
	<i>Alternaria alternata</i>	>400	>800	>400	>1000	>600	>600
SRC	<i>Fusarium oxysporium</i>	>2200	>3000	>800	>3000	>2800	>3000
SRP	<i>Trichoderma viride</i>	>1400	>800	>1200	>1800	>1400	>1800
SRP	<i>Rizopus ahrrizus</i>	>400	>600	>400	>400	>400	>1000
SRP	<i>Rhodotorula rubra</i>	> 600	> 800	> 800	> 1000	> 600	> 1000
AI	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	> 200	> 600	> 400	> 400	> 200	> 1000

		CMI (mgL ⁻¹)					
Fuente de aislamiento	Microorganismo	Cr(VI)	Cu(II)	Cd(II)	Zn(II)	Ni(II)	Pb(II)
T	<i>Bacillus cereus</i> (Clave a)	> 200	> 500	> 200	> 500	> 300	> 600
	<i>Corynebacterium jeikeium</i> (Clave h)	> 300	> 500	> 500	> 500	> 400	> 500
	<i>Bacillus brevis</i> (Clave t)	> 500	> 600	> 600	> 600	> 600	> 600
AI	<i>Bacillus brevis</i> (Clave k)	> 500	> 800	> 500	> 1000	> 500	> 1000
	<i>Bacillus brevis</i> (Clave o)	> 200	> 500	> 300	> 300	> 300	> 600
	<i>Bacillus cereus</i> (Clave f)	> 500	> 800	> 800	> 800	> 800	> 800
	<i>Staphylococcus siumulans</i> (Clave w)	> 200	> 500	> 300	> 500	> 300	> 500
LA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Clave q)	> 500	> 1100	> 500	> 1000	> 500	> 1000
	<i>Acientobacter anitratus</i> (Clave d)	> 200	> 400	> 500	> 500	> 300	> 500
SRP	<i>Pseudomonas flourescens</i> (Clave c)	> 400	> 500	> 400	> 500	> 500	> 600

Los dos aislados pertenecientes al género *Paecilomyces* provienen de fuentes diferentes (T y SRSC), mientras que las tres cepas de *Fusarium* provienen de la muestra (T). La presencia de elementos tóxicos representa un factor importante en el desarrollo de sistemas de resistencia de los organismos expuestos. Los microorganismos presentes en una zona contaminada con metales pesados han sido seleccionados por mostrar estrategias de resistencia a éstos. Así la exposición continua a estos agentes nocivos contribuye no solo a

la selección de microorganismos resistentes, sino también a la propagación de los mecanismos de resistencia más eficientes.

Por lo que los hallazgos de este trabajo manifiestan la interacción ambiente-genotipo, que conllevó a una biodiversidad de aislamientos.

Los aislados además de pertenecer a ecosistemas poco estudiados, también presentan resistencia sobresaliente a metales pesados por lo que podrían presentar potencialidad de uso en la biorremediación lo que implicaría un beneficio ecológico, económico y social. Por otro lado, los microorganismos seleccionados se consideran fuentes potenciales en el campo de la investigación que conllevaría al desarrollo de proyectos de investigación, formación de recursos humanos así como a la generación y difusión de los conocimientos.

4.4 Pruebas preliminares de bioadsorción de metales de la biomasa de los microorganismos que presentaron mayor resistencia multimetálica

Para este experimento se seleccionaron los microorganismos de cada grupo microbiano que mostraron mayores CMI de plomo (II), cromo (VI), cadmio (II), cobre (II) zinc (II) y níquel (II) (epígrafe 3.2). Estos fueron, *Penicillium chrysogenum*, *Acremonium falciforme*, *Trichoderma viride*, *Paecilomyces lilacinus*, *Fusarium oxysporium*, *Rhodotorula rubra*, *Bacillus brevis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus cereus*.

La tabla XIX muestra los porcentajes de remoción de los seis metales en estudio utilizando biomasa de los diferentes tipos de microorganismos seleccionados.

TABLA XVIII. BIOADSORCIÓN DE PB(II), CR (VI), CD (II), CU(II), ZN(II) Y NI(II) UTILIZANDO DIFERENTES BIOMASAS MICROBIANAS A TEMPERATURA DE 25 °C, EN DISOLUCIONES DE 60 MGL⁻¹. 16H DE CONTACTO. (N=3).

Microorganismo/Metal	% de metal removido					
	Cr (VI)	Pb(II)	Cd (II)	Zn(II)	Cu (II)	Ni(II)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	61	78	37.7	25.5	14.55	10.4
<i>Acremonium falciforme</i>	70	83	58.5	28.75	45.6	27.4
<i>Trichoderma viride</i>	47.2	70	27.8	20.5	29.8	16.3
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	57	81	33.75	27.3	32.16	9.8
<i>Fusarium oxysporium</i>	61.15	67.16	41.33	17.3	22.5	18.7
<i>Rhodotorula rubra</i>	21.8	40	33.63	22.6	31.2	27.6
<i>Bacillus brevis</i>	32.5	37.8	22.83	26.3	31.3	24.75
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	18.38	19.7	15.7	4	4.3	3.9
<i>Bacillus cereus</i>	22.8	22.37	8.8	7	25.3	4.4
<i>Bacillus brevis</i>	26.14	34.2	17.4	19.55	22.8	6.2

Las 9 biomasas microbianas bajo las condiciones experimentadas, fueron capaces de remover los seis metales con diferentes porcentajes de remoción. La mayor remoción en todas las biomasas utilizadas correspondió al metal plomo (II) y la menor al níquel (II). Se estima que es posible mejorar la capacidad de remoción metálica de estos microorganismos determinando los factores fundamentales que afectan el proceso y encontrando las condiciones óptimas para la bioadsorción de cada metal con cada tipo de biomasa.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

1. Se aislaron 53 microorganismos de los cuales 34 cepas son hongos filamentosos, 17 cepas son bacterias y dos levaduras. Todos ellos crecieron en concentraciones de 50 mgL^{-1} de cada metal.
2. Se identificaron diez cepas bacterianas y catorce cepas fúngicas (doce hongos filamentosos y dos levaduras) con resistencia sobresaliente a los seis metales en estudio.
3. Entre las cepas bacterianas se encontraron a *Bacillus cereus*, *Bacillus brevis* como cepas predominantes, además de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus simulans*, *Acinetobacter anitratus*, *Corynebacterium jeikeium*. Estos últimos tres no reportados en la literatura como microorganismos de resistencia multimetálica.
4. Las bacterias que presentaron mayor resistencia a todos los metales pesados a una concentración de 500 mgL^{-1} fueron *Bacillus brevis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

5. Los aislados fúngicos fueron identificados como *Acremonium falciforme*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Rizopus arrizus* y *Trichoderma viride*, *Fusarium oxysporium*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum*, siendo los últimos tres los géneros predominantes.
6. Los hongos que tuvieron mayor resistencia al Cu, Cd, Zn y Pb a una concentración de 1000 mg l^{-1} fueron: *Fusarium oxysporium*, *Penicillium chrysogenum*, *Paecilomyces lilacinus* y *Acremonium falciforme*. Los dos últimos no reportados en la literatura como microorganismos de resistencia multimetálica
7. Se estima que los microorganismos obtenidos, debido a su alta resistencia a metales pesados son candidatos a ser estudiados para la producción de biosorbentes de metales pesados, biosensores o como nanofábricas de CdS y ZnS especialmente los hongos filamentosos.

CAPITULO 6

RECOMENDACIONES

El trabajo presentado nos da la pauta para seguir con proyectos de investigación que competen a la búsqueda de aplicaciones tecnológicas de los microorganismos aislados y al estudio de otros ecosistemas de la región, por lo que se recomiendan los siguientes proyectos

1. La optimización de las condiciones para la utilización de la biomasa de los microorganismos aislados como biosorbentes y su aplicación en la industria en los procesos de descontaminación de aguas residuales
2. El aislamiento de los elementos genéticos responsables de la resistencia metálica de los microorganismos obtenidos, para fabricación de biosensores ambientales.
3. El estudio de los microorganismos aislados para determinar su capacidad para la producción de nanopartículas de CdS y ZnS.

APENDICES

Apéndice A

Principios de las pruebas usadas en el sistema BBI- CRYSTAL

Posición en el panel	Característica de la prueba	Código	Principio
4 A	Control fluorescente negativo	FCT	Control para estandarizar los resultados del sustrato fluorescente
2 A	4 MU- β -D-glucósido	FGC	La hidrólisis enzimática del enlace amídico o glicosídico resulta en la producción de un derivado cumarínico fluorescente
1 A	Prolina-AMC	FPR	
4 B	Arginina-AMC	FAR	
2 B	Metionina-AMC	FME	
1 B	4 MU- β -D-celobiósido	FCE	
4 C	4 MU-fosfato	FHO	
2 C	L-ácido piroglutámico-AMC	FPY	
1 C	Triptófano-AMC	FTR	
4 D	L-valina-AMC	FVA	
2 D	L-fenilalanina-AMC	FPH	
1 D	4 MU- α -D-glucósido	FGS	
4 E	Arabinosa	ARA	La utilización de carbohidratos resulta en una caída del pH y un cambio en el indicador (rojo fenol).
2 E	Maltosa	MAL	
1 E	Dextrina	DXT	
4 F	Manitol	MNT	
2 F	Galactosa	GAL	
1 F	N-acetil-D-glucosamina	AGN	
4 G	Trehalosa	TRE	
2 G	Manosa	MNS	
1 G	Maltotriosa	MTT	
4 H	o-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG) y p-nitrofenil- β -D-glucósido	POG	La hidrólisis enzimática del glicósido incoloro arilo sustituido resulta en un p-nitrofenol amarillo.
2 H	p-nitrofenil- α -D-glucósido	AGL	
1 H	p-nitrofenil- β -D-celobiósido	PCE	
4 I	p-nitrofenil- β -D-glucósido	BGL	
2 I	p-nitrofenil-fosfato	PHO	
1 I	p-nitrofenil- α -D-galactósido	PPG	
4 J	Urea	URE	La hidrólisis de la urea y el amonio que resulta cambian el color del indicador de pH (azul de bromotimol).
2 J	Esculina	ESC	La hidrólisis de la esculina en la presencia de ion férrico resulta en un precipitado negro.
1 J	Ornitina	ORN	La utilización de ornitina resulta en una subida del pH y un cambio en el color del indicador (púrpura de bromocresol).

Apéndice B

Principios de las pruebas usadas en el sistema API E

Tests	Substratos	Reacciones/enzimas	Resultados	
			Negativo	Positivo
ONPG	Orto-nitro-fenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) isopropil-tiogalactopiranosido (IPTG)	eta-galactosidasa	incoloro	Amarillo(1)
<u>ADH</u>	Arginina	arginina dehidrolasa	amarillo	Rojo/ naranja(2)
<u>LDC</u>	Lisina	lisina descarboxilasa	amarillo	Rojo/ naranja(2)
<u>ODC</u>	Ornitina	ornitina descarboxilasa	amarillo	Rojo/ naranja(2)
<u>ICIT</u>	Citrato sódico	utilización de citrato	verde pálido/ amarillo	azul-verdoso/ azul(3)
<u>H₂S</u>	Tiosulfato sódico	producción de H ₂ S	Incoloro/ grisáceo	depósito negro/ línea sutil
<u>URE</u>	Urea	ureasa	amarillo	rojo/naranja(2)
TDA	Triptofano	triptofano desaminasa	amarillo	marrón-rojo
IND	Triptofano	producción de indol	amarillo	rosa
<u>VP</u>	Creatinina piruvato sódico	producción de acetoína	Incoloro, verde pálido/ amarillo	rosa/ rojo(5)
<u>IGEL</u>	Gelatina Kohn	gelatinasa	No hay difusión de pigmento negro	difusión de pigmento negro
GUL	Glucose	fermentación/ oxidación(4)	azul/ azul verdoso	Amarillo/ amarillo gris
MAN	Manital	fermentación/ oxidación(4)	azul/ azul verdoso	amarillo
INO	Inositol	fermentación/ oxidación(4)	azul/ azul verdoso	amarillo
SOR	Sorbitol	fermentación/ oxidación(4)	azul/ azul verdoso	amarillo
RHA	Ramnosa	fermentación/ oxidación(4)	azul/ azul verdoso	amarillo
SAC	Sacarosa	fermentación/ oxidación(4)	azul/ azul verdoso	amarillo
MEL	Melibiosa	fermentación/ oxidación(4)	azul/ azul verdoso	amarillo
AMY	Amigdalina	fermentación/ oxidación(4)	azul/ azul verdoso	amarillo
ARA	Arabinosa	fermentación/ oxidación(4)	azul/ azul verdoso	amarillo
OX		Citocromo-oxidasa	Incoloro	Morado

(1) Un amarillo muy pálido debe considerarse como positivo.

(2) Un color naranja que aparece después de 36-48 h de incubación debe considerarse como negativo.

(3) La lectura debe hacerse en la cúpula (zona de aerobiosis).

(4) La fermentación empieza en la parte inferior de los tubos, la oxidación empieza en la cúpula.

(5) La aparición de una coloración roa pálido después de 10 minutos debe considerarse como negativa.

BIBLIOGRAFÍA

- **Ackareley, D.F., González, C.F. Park, C.H., Blake, R., Keyhan, M., Matin, A. (2004).** Chromate-reducing Properties of Soluble Flavoproteins from *Pseudomonas putida* y *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.** **70**:873-882.
- **Akar, T., Tunalı, S. (2005).** Biosorption characteristics of *Aspergillus flavus* biomass for removal of Pb(II) and Cu(II) ions from an aqueous solution **Bioresour Technol.** Oct 24; [Epub ahead of print]
- **Aksu, Z., Donmez, G. (2001).** Comparison of copper(II) biosorptive properties of live and treated *Candida* sp. **J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.**;36(3):367-81.
- **Alanís J. M.** “Demandarán a Pyosa, la SSA y Profepa por la contaminación con plomo en Monterrey”, **Crónica de Hoy**, 14 de julio de 1999.
- **Albert L.A., Badillo F. (1991).** Environmental Lead in Mexico. **Rev. of Environ. Contamination and Toxicol.** **181** 1-49.
- **Amoroso, M.J., Castro, J.R. y Durán, A. (2001).** Chromium Accumulation by *Streptomyces* sp. isolated from riverine sediments. **J. of Ind. Microbiol. and Technol.** **26** (4):210-215.
- **Anand, P., Isar, J., Saran, S., Saxena, R.K. (2005).** Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. **Bioresour Technol.** Nov 29; [Epub ahead of print]
- **Anisimova, L., T. Siunova & A. Boronin. (1993).** Resistance to metals gram negative bacteria isolated from sewage and soils of industrials regions. **Microbiology.** **62**(5): 505-508.
- **Atkinson, B.W.,F. Bux y Kassan H.C. (1998).** Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents. **Water SA.** **24**: 129-13
- **Atlas, Ronal M. and Bartha R. (1993).** Microbial Ecology Fundamentals and Applications. Ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc
- **Barnett, H.L. and Barry B. Hunter. (1972).** Illustrated Genera Of Imperfect Fungi. Ed. Burgess Publishing Company. 90,114, 126, y 128.
- **Barnett, H.L. y Hunter, B.B. (1999)** Illustrated Genera of Imperfect Fungi 4th Ed. The American Phytopathological Society. St Paul Minnesota.
- **Barnett, J.A., Payne, R.W. y Yarrow, D. (2000).** The Yeast. Cambridge University. New York.
- **Bellion, M., Courbot M, Jacob C, Blaudez D, Chalot M. (2006).** Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi **FEMS Microbiol Letters.** **254**(2):173-81.

- **Beolchini, F., Pagnanelli, F., Veglio, F. (2001)** Modeling of copper biosorption by *Arthrobacter* sp. in a UF/MF membrane reactor. *Environ Sci Technol.* **15;35**(14):3048-54
- **Beveridge T.J. y Fyfe, W.S. (1985).** Metal fixation by bacterial cell wall. *J. Can of Earth Science.* **22** 1983- 1988.
- **Beveridge, T.J. y Doyle, R.J. (1989).** Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. *Annual Review* **43**: 147-171
- **Beveridge, T.J. y Murray, R.G.E. (1980).** Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J. of Bacteriol.* **141**: 876-887.
- **Beveridge, T.J. y Murray, R.G.E.(1980).** Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J. of Bacteriol.* **141**: 876-887.
- **Birch, L. y Bachoferon, R. (1990).** Complexing agents from microorganisms. *Experientia* **46**: 827-834.
- **Blumenroth, P., Dettmers, H. y Bosecker, K. (1997).** Isolation of microorganisms from mining waste waters for cyanide degradation and biosorption of heavy metals. Federal Institute for Geosciences al Natural Resources. Hannover.
- **Bontidean, I., Lloyd, J.R., Hobman, J.L., Wilson, J.R., Csoregy, E., Mattiasson, B., Y Brown, N.L. (2000)** Bacterial metal resistance protein and their use in biosensors for detection of bioavailable heavy metals. *J. Inorg. Biochem.* **79**:225-229.
- **Bontidean, I., Mortari, A.y Leth. S. (2004).** Biosensors for detection of mercury in contaminated soils. *Environ. Pollution.* **131**: 255-262.
- **Borremans, B., Hobman, J.L., Provoost, A., Brown, N.L., Van der Leile, D. (2001).** Cloning and Functional Analysis of PbR Lead Resistance Determinant of *Ralstonia matallidurans* CH34. *J. Bacteriol.* **183**: 5651-5658.
- **Botello, A. V., Rojas, J. C., Benítez, J. A. y Zárata L.D. (1998).** Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. *Epomex Serie Científica SEP2*.
- **Birch, L.y Bachoferon, R. (1990).** Complexing agents from microorganisms.*Experientia* **46**: 827-834.
- **Brierley, C., Brierley J (1997).** Microbiology for the metal mining industry. En Hurst CJ (Ed) Manual of Environmental Microbiology. **ASM Press, Washington, D.C.** 876
- **Brierley, C.L (1978).** Bacterial leaching. CRC *Critical Reviews in Microbiology* **6**:207-262.
- **Brown, N.L., Lee, B and Silver.S. (1994).** Bacterial transport of and resistance to copper. Metals Ions in *Biological Systems*, **30**, 405.
- **Buchanan R.E., and Gibsons, N.E. (1994).** The Bergey's of Determinative of Bacteriology 9thed. The William's and Wilkin's. Co. Baltimore.
- **Camargo, F.A.O., Bento, F.M., Okeke, B.C. y Frankenberger W.T. (2003).** Chromate Reduction by chromium-resistant bacterial isolated from soils contaminated with dichromate. *J. Environ. Qual.* **32**: 1228-1233.
- **Cañizares-Villanueva, R.O. (2000).** Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* **42**: 131-143.
- **Cardonha, A.M.S., Rodríguez, D.P., Macre, A.y Peirano, G. (2004).** Fecal pollution in water from storm sewers and adjacent seashores in natal Rio Grande do Norte, Brazil. *International Microbiology.* **7**: 213-218.

- **Cervantes, C., Gutierrez-Corona, F. (1994).** Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol Review*. **14(2)**:121-37.
- **Cervantes, C. & S. Vaca. (1990).** Resistencia bacteriana a los metales pesados tóxicos. *Ciencia y Desarrollo*. **17(102)**: 86-96.
- **Chen, J., Czajka, D., Lion, L., Shuler M., Ghiorse, W (1995).** Trace metal mobilization in soil by bacterial polymers. *Environ. Health Perspect.* **103**: 53-58
- **Chen, J., Hao, O. (1998).** Microbial Chromium (VI) reduction. *Crit. Rev. Env. Sci. Tech.* **28**: 219-251. Chen Z, Ken L, Shao Q, Shi D, Ru B (1999) Expression of mammalian metallothionein-I gene in cyanobacteria to enhance heavy metal resistance. *Mar. Pollut. Bull.* **39**: 155-158.
- **Chen, S., Wilson, D.B. (1997).** Construction and characterization of *Escherichia coli* genetically engineered for bioremediation of Hg^{+2} – contaminated environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2442-2445.
- **Cho, D.H., Kim, E.Y. (2003).** Characterization of Pb^{2+} biosorption from aqueous solution by *Rhodotorula glutinis*. *Bioprocess Biosyst Eng.* **25(5)**: 271-277.
- **Cotoras, D., Viedma, P. y Pimentel J. (1993).** Biosorption of metal ions by attached bacterial cell in a packed-bed bioreactor. *Biohydrometallurgical Technology*. **2** : 110-130
- **Clifford, L. Wang., Peter, C., Michels, Scott C., Dawson, Sitsari., Kitisakkul, John A., Baross, J.D., Keasling, and Douglas, S. Clark. (1997).** Cadmium Removal by a New Strain of *Pseudomonas aeruginosa* in Aerobic Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4075-4078.
- **Corbisier, P., Van der Lilie, D., Borremans, B., Provoost, A., de Lorenzo, V., Brown, N.L., Lloyd, J.R., Hobman J.L. (1999).** Whole cell-and protein based biosensors for detection of bioavailable heavy metals in environmental samples. *Analyt. Chim. Acta.* **387**: 235-244.
- **Cotoras, S. A., Viedma. P. y Rojas, O. (1993).** Continuous removal of copper by attached bacteria. *Biohydrometallurgical processing*. **2**: 103-110.
- **Dave, S.R., Natarajan, K.A. (1987).** Microbial Ecology of some Indian Sulphidic mines. *Transactions of the Indian Institute of Metals.* **40(4)**: 315-327.
- **De Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gene, and M. J. Figueras. (2000).** Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed, 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands
- **Díaz-Raviña, M., Bath, E. Y Frostegard, A. (1999).** Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by thymidine incorporation technique. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2238-2247.
- **Dietrich, H., Nies. (1999).** Molecular biology and utilisation for biotechnological processes. *Institut für Mikrobiologie*. 1-4
- **Ehrlich, H.L. y C.L. (Brierley 8eds.) (1990).** Microbial Mineral Recovery, McGraw-Hill.

- **El-Helow, E.R., Sabry, S.A., y Amer, R.M. (2000).** Cadmium biosorption by a cadmium resistant strain of *Bacillus thuringiensis*: regulation and optimization of cell surface affinity for metal cations. ***Biometals*. 13 (4): 273-280.**
- **Firth N., Apiziridej S., Berg T., Curnock S., Dyke K., and Skurray R., (2000).** Replication of Staphylococcal Multiresistance Plasmid. ***J. Bacteriol.* Vol. 182 (8). 2170 – 2178.**
- **Ford, T., Mitchell R (1992)** Microbial transport of toxic metals. En Mitchel R (Ed) Environmental Microbiology. **Wiley-Liss. New York.** 321-342.
- **Ford, T., Ryan D (1995).** Toxic metals in aquatic ecosystems: A microbiological perspective. ***Environ. Health Perspect.* 103: 25-28.**
- **Funch, G.W. y Chen, M. (1975).** Microbial basis of phosphate removal in the active sludge process to the treatment of the wastewater. ***Microbiol Ecol.* 2: 261-167.**
- **Gadd, G.M. y White C. (1993).** Microbial treatment of metal pollution – a Working biotechnology. ***Trends biotechnol.* 11: 352-359.**
- **Gadd, G.M., (2000).** Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. ***Current Opinion in Biotechnology* 11: 271-279.**
- **Gaylarde, C.C., Videla H.A. (1995).** Bioextraction and biodeterioration of metals. The biology of world resources series. Great Britain. Cambridge.
- **Gazsó, L.G. (2001).** The key microbial processes in the removal of toxic metals and radionucleotides from environment. ***CEJOEM* . 7 (3-4):178-185.**
- **Ghosh, S., Mahapatra, N.R., Banerjee, P.C. (1997).** Metal Resistance in *Acidocella* Strains and Plasmid-Mediated Transfer of this Characteristic to *Acidiphilium multivorum* an *Escherichia coli*. ***Appl. And Environ. Microbiol* 63(11): 4523-4537**
- **Gomes, N.C.M., Rosa C.A. y Pimentel P.F. (2002).** Uptake of free and complexed silver ions by different strains of *Rhodotorula mucilaginosa*. ***Brazilian Journal of Microbiology.* 33: 62-66.**
- **Gómez, Y., O.Coto., Abín, C. Hernández. (2002).** Método efectivo para el aislamiento de bacterias resistentes a níquel y cobalto. ***Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 33 (1): 27-31).**
- **Gómez, Y., Coto, O., Capote, J., Abin, L., Perera, J., in: Amils R. and Ballester A. (1999) (Ed.), Biohydrometallurgy and The Environment Toward the Mining of The 21st Century and the Processing. Elsevier, Part A, 673-679.**
- **González, J., Moreno, A.M., Pérez, L., Larrea, M. T. (2000).** Nivel de contaminación en suelos por elementos traza, impacto sobre las comunidades microbianas. ***Edafología.* 7 (3): 47-54.**
- **Gulgry O., M Lazard, F. Delrot, M. Dauplais, I. Grigoras, S. Blanquet , P. Plateau. (2003).** ***Eur. J. Biochem.* 270: 2486-2496.**
- **Hall, J.L. (2002).** Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. ***J. Exp. Bot.* 53(366):1-11.**
- **Harris, P.O. y G.J. Ramelow (1990).** Binding of metal ions by particulate biomass derived from *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda*. ***Environ. Sci. Technol.* 24:220-228.**
- **Ivanitsa, V., Khudechenko, G., Yelinska, N., Bukhtiyarov, A., Vorokhova, O. (1999).** The effect of toxic metals on getherotrophic marine bacteria isolated from black sea. In The Black sea Ecological Problems Odessa. Pp 98-102. Ukraine.

- **J.Lodder, N.J.W. Kreger-Van Rij. (1967).** The Yeasts. **Ed. North-Holland.**131-133.
- **Kennish, M.J. (1992).** Ecology of Estuaries: Antropogenic Effects. Ed. CRC Press, Inc.Boca Raton, FL.
- **Kiefer, N., Tobin, J. (2000).** Mechanisms of microbial metal resistance. **B.Sc. In Biotechnol.** . 1-30.
- **Koneman, Elmer W., Allen., Dowell., Janda., Sommers., Winn. (1997).** Diagnóstico micro-biológico_ **Ed.Panamericana.** 657-715.
- **Kurtzman, C. P., and J. W. Fell (ed.). (2000).** The Yeasts_ A Taxonomic Study. Elsevier Scientific B.V., Amsterdam, The Netherlands
- **Kuyucak, N. (1990).** Feasibility of biosorbents application, In: Biosorption of Heavy Metals, Volesky B., (Ed) CRC Press , Boca Ratón, Florida , pp 372-377.
- **Larone, D. H. (1995).** Medically Important Fungi - A Guide to Identification, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- **Lawson, E.N. (1997).** The biological removal of hexavalent chrome from ferrochrome manufacturing process water. (IBS) **International Biohydrometallurgical Symposium. Biomined International Conference,** August,: 1,2.
- **Lee, M.H. and Bradley, M. Tebo. (1998).** Surface Charge Properties of and Cu (II) Adsorption by Spores of the Marine *Bacillus* sp. Strain Sg-1. **Appl Environ Microbiol**, **64**: 1123-1129.
- **Lemke, P.A. (1993).** Stress tolerance of fungi. **Mycology Series.** Edited by D.H. Jennings, the University of Liverpool, Liverpool England
- **Leung, W.C., Chua, H. y Lo W. (2001).** Biosorption of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge. **Appl. Biochem** **91**: 171-84.
- **Lindsay, J., Riley T (1994)** Staphylococcal iron requirements, siderophore production, and iron-regulated protein expression. **Infec. Immun.** **62**: 2309-2314.
- **Lo, W., Ng, L.M.,, Chua, H., Yu, P.H., Sin, S.N., Wong, P.K. (2003).** Biosorption and desorption of copper (II) ions by *Bacillus* sp. **Appl Biochem Biotechnol.** **105**:581-91.
- **López Gutiérrez, J., García Menéndez, O., Grima Olmedo, J., Ballesteros Navarro, B. J. y Pérez Gago, M. (2001).** Técnicas de Biorrecuperación In Situ en Acuíferos Contaminados por Metales Pesados. **Instituto Geológico de España.** 233-243.
- **Lovley, D.R., (ed). (2000).** Environmetal Microbe-Metal Interactions, American Society for Microbiology, Washington D.C.
- **Lovley. D.R, Coates, J.D. (1997).** Bioremediation of metal contamination. **Curr. Opinion Biotechnol.** **8**: 285-289.
- **M.D. Mullen, D. C. Wolf, F. G. Ferris, t. J. Beveridge, C. A. Flemming, and G.W. Bailey. (1989).** Bacterial Sorption of Heavy Metals. **Appl. Environ. Microbiol.** **55**:3143-3149.
- **Malakul, P., Sinivasan, K.R. y Wang H. Y. (1998).** Metal Toxicity reduction in naphthalene biodegradation by use of metal-chelating adsorbents. **Applied and Environmental Microbiology.** **64**, 11, 4610-1613.
- **Maddocks, J.L. and M. Greenan. (1975).** Rapid method for identifying bacterial enzymes. **J. Clin. Pathol.** **28**: 686-687. (BBL CRYSTAL)
- **Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J (2000).** Biology of Microorganisms Prentice Hall N.J., 642-719.

- **Manafi, M., W. Kneifel, and S. Bascomb. (1991).** Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiol.Rev.* **55**: 335-348. (BBL CRYSTAL)
- **Mangels, J., I. Edvalson, and M.Cox. (1993).** Rapid Identification of *Bacteroides fragilis* group organisms with the use of 4-methylumbelliferone derivative substrates. *Clin Infect. Dis.* **16 (54)**: 5319-5321(BBL CRYSTAL)
- **Marrero, J., López, L.J., Sánchez, A., González, W., Ayala, M., Paz-Lago, D., Fallarero, A., Castellanos, L., Coto, O. (2004).** Effect of high concentration of Co(II) on *Enterobacter liquefaciens* strain C-1: A bacterium highly resistant to heavy metals with an unknown genome. *Proteomics* **4**: 1265-1279.
- **McAfee, B.J., Gould, W.D., Nadeau, J.C. y Da Costa, A.C.A. (2001).** Biosorption of metal ions using chitosan, chitin and biomass of *Rhizopus oryzae*. *Separation Science and Technol.*
- **McEldowney, S. (2000).** The impact of surface attachment on cadmium accumulation by *Pseudomonas fluorescens* H2. *FEMS Microbiol. Ecol.* **33**: 121-128.
- **Megharaj, M., Avudainayagam, S.y Naidu, R. (2003).** Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste. *Curr. Microbiol.* **47 (1)**: 51-54.
- **Mergeay, M., Nies, D. y Schlegel, H.G. (1985).** *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* **162**: 328-334.
- **Mogollon L., Rodríguez R. Larrota W., Ramírez N., Torres R. (1998).** Biosorption of nickel using filamentous fungi. *Appl Biochem Biotechnol.* **70, 72**: 593-601
- **Moncla, B, J., P. Braham, L.K Rabe, and S.L. Hiller. (1991).** Rapid presumptive identification of black-pigmented gram-negative anaerobic bacterial by using 4-methylumbelliferone derivatives. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1955-1958. (BBL CRYSTAL)
- **Mondaca, M., M. Abarzúa, K. Paredes, T. Maugeri & M. Martínez. (1993).** Transferencia de resistencia a metales pesados en bacterias aisladas del río Bío Bío, VII Región, Chile. *Rev. Latinomer. Microbiol.,* **35**: 39-43.
- **Montoya (1996).**“ Toxicología Clínica”. Editorial Francisco Méndez Cervantes; México, D.F.
- **Montuelle, B., X. Latour, B. Volat & A. Gounet. (1994).** Toxicity of heavy metals to bacteria in sediments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **53**: 753-758.
- **Moraga, R., Merino, C., y Mondaca, M.A. (2003).** Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Investigaciones Marinas.* **31 (1)**:1-7 Versión en-línea.
- **Mulligan, C.N., Galvez-Cloutier, R. (2003).** Bioremediation of metal contamination. *Environ Monit Assess.* **84(1-2)**:45-60.
- **Naja, G., Mustin, C., Berthelin, J., Volesky, B. (2005)** Lead biosorption study with *Rhizopus arrhizus* using a metal-based titration technique. *J Colloid Interface Sci.* **292(2)**:537-43.
- **Nies, D.H (2000)** Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnology use of *Ralstonia* sp. CH4. *Extremophiles* **4**: 77-82.
- **Nies, D.H. (1999)** Microbial Heavy Metals resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51, 6**, 730-750.

- **Nies, D.H. (1992).** Resistance to cadmium, cobalt, zinc, nickel in microbes. *Plasmid* **27**:17-28.)
- **Ochiai, E.I. (1987).** General principles of biochemistry of the elements. Plenum Press, New York p 648.
- **Ozer, A., Ozer, D. (2003).** Comparative study of the biosorption of Pb(II), Ni(II) and Cr(VI) ions onto *S. cerevisiae*: determination of biosorption heats. *J Hazard Mater.* **100**(1-3):219-29.
- **Pan, J.H. y Liu, R.X. (2004).** Biosorption of Pb^{2+} by *Bacillus cereus* biomass. *Huan Jing Ke Xue* **25** (2): 166-169.
- **Podgorskii, V.S., Kasatkina, T.P., Lozovaia, O.G. (2004).** Yeasts, biosorbents of heavy metals. *Mikrobiol Z.* **66**(1):91-103.
- **Pradham, A.A. y Levine, A.D., (1995).** Role of extracellular components in microbial biosorption of copper and lead. *Wat. Sci. Tech.* **26** (9-11):2153-2156.
- **Pramod K. Sharma, David L. Balkwill, anatoly Frenkel, and Murthy A. Vairavamurthy . (2000).** A New Klebsiella planticola Strain (Cd-1) Grows Anaerobically at High Cadmium Concentrations and Precipitates Cadmium Sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3083-3087.
- **Price, M.S., Classen, J.J., Payne, G.A. (2001)** *Aspergillus niger* absorbs copper and zinc from swine wastewater. *Bioresour Technol.* **77**(1):41-9.
- **Puranik, P.R. and Paknikar, K.M. (1999).** Biosorption of lead, cadmium and zinc by *Citrobacter* strain MCM B- 181: Characterization studies. *Biotechnol. Prog.*, **15**(2), 228-237.
- **Richards, J.W., Krumholz, G.D., Chval, M.S. y Tisa, L.S. (2002).** Heavy metals resistance patterns of *Frankia* stains. *Appl. And Env. Microbiol.* **68** (2): 923-927.
- **Roane, T.M. y Pepper, I.L. (1999).** Microbial responses to environmentally toxic cadmium. *Microbiol. Ecol.* **38** (4): 358-364.
- **Salinas, E.; Elorza de Orellano, M.; Rezza, I. (2000).** Removal of cadmium and lead from dilute aqueous solutions by *Rhodotorula rubra*. *Bioresource Technology.* **72**:107-112
- **Sato, M., Kondoh, M. (2002).** Recent studies on metallothionein: protein against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *J Exp. Med* **196** (1): 9-22.
- **S-Bai, R., Abraham, T.E. (2001).** Biosorption of Cr (VI) from aqueous solution by *Rhizopus nigricans*. *Bioresour Technol.* **79**(1):73-81.
- **Schmitd, T., y Schlegel H.G. (1994).** Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31 A. *J. Bacteriol* . **176**: 7045-7054.
- **Schwyn, B., Neilands, J (1987)** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Ann. Biochem.* **160**: 47-56.
- **Sharma, P.K., Balkwill, D.L., Frenkel, A. and Vairavamurthy, M.A., (2000).** A new Klebsiella planticola Strain (Cd-1) Grows Anaerobically at High Cadmium Concentrations and Precipitates Cadmium Sulfide. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(7): 3083-3087.
- **Silóniz, M., Lorenzo, P., Perera, J (1991).** Distribution of oxidizing bacterial activities and characterization of bioleaching related microorganisms in a uranium mineral heap. *Microbiologia SEM.* **7**: 82-89.
- **Silva, J., Avello, C., Matamoro, F., Villagra, L., Rojas, V. y Sandoval L. (1999).** Antimicrobial resistance of different *Acinetobacter baumannii* biotypes isolated in the northern region of Chile. *Revista Médica de Chile.* **127** No. 8

- **Silver, S. (1996).** Bacterial resistances to toxic metal ions - a review. **Gene** **179**: 9-19
- **Silve,r S. (1995)** Bacterial heavy metals resistance systems and possibility of bioremediation. **Biotechnology, Bridging research and applications**. 256-287. Kluwer Academic Publishers London
- **Silver, S. & M. Walderharg. (1992).** Gene regulation of plasmid and chromosome determined inorganic ion transport in bacteria. **Microbiol. Rev.**, **56(1)**: 195-228.
- **Silver, S., and T.K. Misra. (1988).** Plasmid-mediated heavy metal resistance. **Annu. Rev. Microbiol.** **42**:717-743.
- **Simmons, P. y Singleton, I.A. (1996),** A Methods to increase sliver biosorption by an industrial strain of *Saccaromyces cerevisiae*, **Appl. Microbiol. Biotechnol** **45**: 278-285.
- **Spain, A. y Alm, E. (2003).** Implications of microbial heavy metal tolerance in environment. **Review in Undergraduate Research**. **2**: 1-6.
- **Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P.W., Garg, S.K., (2002).** Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. **Chemosphere** **48**: 427-435.
- **Su, H., Wang, Z., Tan, T. (2003).** Adsorption of Ni²⁺ on the surface of molecularly imprinted adsorbent from *Penicillium chysogenum* mycelium. **Biotechnol Lett.** **25(12)**:949-53.
- **Tan, T., Cheng, P.(2003).** Biosorption of metal ions with *Penicillium chrysogenum*. **Appl Biochem Biotechnol.** **104(2)**:119-28.
- **Tietzel, G.M. y Parsek, M.R. (2003).** Heavy Metal Resistance of biofilm and plantktonic *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Env. Microbiol.** **69** : 2312-2320
- **Treen- Sears, M.E., (1986).** Propagation y Characterization de *Rhizopus* Biosorbents, PhD Thesis, McGill University, Montreal Québec.
- **Tsekova, K. y Petrov, G. (2002).** Removal of heavy metals from aqueous solution using *Rhizopus delemar* mycelia in free and polyurethane-bound foam. **Z. Naturforsch.** **57c**: 629-633.
- **Tsezos, M. (1999).** Biosorption of metals. The experience accumulated and the outlook for technology development. Biohydrometallurgy and the environments toward the mining of the 21st century. Amils and Ballester (ed) Elsevier. Part B p 171-173.
- **Upreti, R.K., Shrivastava, R, y Chaturvedi, U.C. (2004).** Gut microflora and toxic metals: Chromium as a model. **Indian J. Med Res.** **119**: 49-59.
- **Valdés Perezgasga F., Cabrera Morelos V.M. (1999).** La Contaminación por metales pesados en Torreón, Coahuila, México. **Texas Center for Policy Studies**. En defensa del ambiente, A.C. Primera Edición. 1-46.
- **Valdez-Perezgasga F. (2001).** El caso Peñoles: contaminación por metales pesados en Torreón Coahuila, Ecológica.
- **Valentine. N.B., Boltron, Jr., Kingsley, M.T., Drake, J.R. (1996).** Biosorption of cadmium, cobalt, nickel and strontium by *Bacillus simplex* strain isolated from vadose zone. **J. Ind Microbiol.** **16** (3): 189-196.
- **Vargas E., Álvarez A.H., Cervantes C. (1998).** Bacterial systems for expelling toxic metals. **Rev. Latin- Amer. Microbiol.** **40** (1-2): 53-71
- **Viti, C., Pace, A. y Giovannetti, L. (2003).** Characterization of Cr (VI)-resistant bacteria isolated from chromium-contaminated soil by tannery activity. **Curr. Microbiol.** **46(1)**:1-5.

- Volesky Bohumil. (1990). Biosorption of Heavy Metals, Ed. CRC Press.
- Volesky, B. (1999). Biosorption for the next century. Chemical Engineering Department. Mc Gill University, Canadá
- Volesky, B. y Holan, R. (1995) Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog.* 11(3):235-250.
- Volesky, B. (1994). Advances in biosorption of metals: selection of biomass types, *FEMS Microbiol. Reviews*, 14: 291-302.
- Vullo, D. L. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*. 2 (3): 1-18.
- Wang, C.L., Michels, P.C., Dawson, S.C., Kitisakkul, S., Baross, J.A., Keasling, J.D. and Clark, D.S., (1997). Cadmium Removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in Aerobic Culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(10): 4075-4078.
- Wase, J., Forster, C., (1997). Biosorbents for metal ions, Taylor & Francis Publishers, Gran Bretaña,
- Yang, Q., Wang, J.L., Xing, Z. (2005) Biosorption of cadmium by fungal biomass of *Aspergillus niger*. *Biomed Environ Sci*. 18(3):141-5.
- Yan G, Viraraghavan T. (2003). Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Res*. 37(18):4486-96.